

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Martin Reincke

Tripartite Motif Family Protein 9

**Das genetisch determinierte Expressionsniveau moduliert
die angeborene antivirale Immunität und Virusreplikation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von
Johannes Christoph Rückel
aus Bremen
2018

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß

Mitberichterstatter: PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl
Prof. Dr. Anne Krug
Prof Dr. Norbert Grüner

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Dharmendra Pandey

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 19.04.2018

Eidesstattliche Versicherung

Rückel, Johannes Christoph

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Tripartite Motif Family Protein 9

-

Das genetisch determinierte Expressionsniveau moduliert
die angeborene antivirale Immunität und Virusreplikation

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle nachgewiesen habe.

Des Weiteren erkläre ich, dass alle nicht näher gekennzeichneten Daten Ergebnisse der eigenen Datenerhebung im Zeitraum von März 2014 bis Mai 2015 sind. Unpublizierte Daten, die durch Kooperationsgruppen oder andere Mitglieder der Arbeitsgruppe erhoben wurden - insbesondere durch Doktoranden, die sich innerhalb der Arbeitsgruppe zuvor mit vorausgegangenen Fragestellungen beschäftigten - sind durch entsprechende Fußnoten auf derselben Seite eindeutig gekennzeichnet.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Freiburg, den 23. April 2018

.....

Meinen Eltern
Elisabeth und Andreas

Inhaltsverzeichnis

Seite

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Angeborene und erworbene Immunität	1
1.1.2	Antivirale Aktivität des angeborenen Immunsystems	2
1.1.2.1	Viren - parasitäre Partikel genetischen Materials	2
1.1.2.2	Mustererkennungsrezeptoren für virale RNA: <i>Toll-like</i> -Rezeptoren (TLR) und RIG-I- <i>like</i> -Rezeptoren (RLR)	3
1.1.2.3	Antivirale Immunantwort und Zytokininduktion	5
1.2	<i>TRIPartite-Motif</i> -Proteine (TRIM)	6
1.2.1	Klassifikation der TRIM-Proteinfamilie	6
1.2.2	TRIM-Proteine: Regulatoren der antiviralen Immunität	7
1.2.3	TRIM9: Aktueller Stand der Literatur	8
1.2.3.1	TRIM9 im neurowissenschaftlichen Kontext	9
1.2.3.2	TRIM9 im immunologischen Kontext	9
1.3	Vorarbeiten	11
1.3.1	Korrelation eines Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) der 3'UTR von TRIM9 mit dem Ausgang einer Hepatitis-C-Virus-Infektion	11
1.3.2	TRIM9- <i>knock-down</i> : Inhibition der RLR-induzierten Immunantwort	13
1.4	Arbeitshypothese und Fragestellung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Materialien	15
2.1.1	Geräte und allgemeine Verbrauchsmittel	15
2.1.1.1	Geräte	15
2.1.1.2	Bestellbare Extraktions- und Analyse- <i>kits</i>	16
2.1.1.3	Chemikalien und Verbrauchsmittel	16
2.1.1.4	Puffer, Lösungen und Medien	19
2.1.2	Projektspezifische Materialien	21
2.1.2.1	Zelllinien	21
2.1.2.2	Antikörper	22
2.1.2.3	Plasmide	22
2.1.2.4	PCR- <i>primer</i>	23
2.1.2.5	qRT-PCR: <i>Primer</i> und Sonden	24
2.1.2.6	siRNAs	25
2.1.2.7	Stimulantien	25
2.2	Methodik	26
2.2.1	Zellulär-immunologische Methoden	26
2.2.1.1	Zellkultur	26
2.2.1.2	Transfektion und Stimulation von Zellen	27
2.2.1.3	Stabile Überexpression durch retrovirale Transduktion	28
2.2.1.4	CRISPR/Cas9: Etablierung stabiler <i>Knock-out</i> -Zelllinien	29
2.2.1.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und <i>western-blot</i>	30
2.2.1.6	ELISA: Quantifizierung von IP-10, IL-6, TNF- α	31
2.2.1.7	Dualer Luciferase- <i>assay</i>	32
2.2.1.8	Virustiterbestimmung mittels TCID50-Endpunktverdünnungs- <i>assay</i>	35
2.2.1.9	Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	36
2.2.1.10	Durchflusszytometrie	37
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	38
2.2.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese	38
2.2.2.2	Klonierung	39
2.2.2.3	Mutations- <i>screening</i> : T7-Endonuklease-Verdau und Sequenzierung	39

2.2.2.4	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	41
2.2.3	Statistische Analyse	42
3	Ergebnisse	43
3.1	Beeinflussung des TRIM9-Expressionsniveaus	43
3.1.1	Der SNP rs12879906 in der TRIM9-3'UTR beeinflusst die TRIM9-Genexpression	43
3.1.2	Die Aktivierung des TLR3-Signalweges sowie die Stimulation mit Interferon- β und Interferon- γ führt zu einer verminderten Expression von TRIM9	45
3.2	Etablierung stabiler Zelllinien mit <i>knock-out</i> beziehungsweise Überexpression von TRIM9	52
3.2.1	CRISPR/Cas9: Etablierung TRIM9-defizienter Zellmodelle	52
3.2.1.1	Zelllinie 1205Lu	53
3.2.1.2	Zelllinie A549	56
3.2.1.3	Zelllinie Huh7.5	58
3.2.2	Retrovirale Transduktion: Etablierung stabil TRIM9-überexprimierender Zellli- nien	58
3.2.3	STR-Analyse etablierter Einzelzellklone	60
3.3	Der Einfluss der TRIM9-Expression auf ssRNA-Virus-Infektionen <i>in vitro</i>	63
3.3.1	Infektionen mit (-)ssRNA-Viren	63
3.3.1.1	Virusreplikation und Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen . . .	63
3.3.1.2	Eine transiente TRIM9-Überexpression inhibiert die Replikation des <i>Vesicular-stomatitis</i> -Virus (VSV)	70
3.3.1.3	Keine Kolokalisation von TRIM9 und VSV	73
3.3.2	Infektionen mit (+)ssRNA-Viren	74
3.3.2.1	Virusreplikation und Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen . . .	75
3.3.2.2	Stimulation mit RNA-Isolaten HCV-infizierter Zellen	79
3.4	Modulation der Signalwege des angeboren antiviralen Immunsystems durch TRIM9 . .	80
3.4.1	TRIM9 als Inhibitor der Aktivierung von NF- κ B	80
3.4.2	Der Einfluss von TRIM9 auf die RLR-induzierte Immunantwort	83
3.4.2.1	Der Einfluss des TRIM9- <i>knock-outs</i> auf die RLR-induzierte Immun- antwort	84
3.4.2.2	Die Hemmung der RLR-induzierten Zytokinantwort nach siRNA- <i>knock-</i> <i>down</i> von TRIM9 beruht auf einem TRIM9-unabhängigem Nebenef- fekt der siRNA	88
3.4.3	Kein Einfluss der TRIM9-Expression auf die Interferon- β -induzierte Sekretion von IP-10	91
3.4.4	Gesteigerte TLR3-induzierte Zytokinantwort in TRIM9-defizienten Zellen . . .	92
3.4.5	Gesteigerte Induktion von ISG-15 in TRIM9-defizienten Zellen	95
3.5	Rekonstitutionsversuche der durch die TRIM9-Defizienz supprimierten Virusreplikation	97
3.5.1	Inhibition von NF- κ B durch ACHP	97
3.5.2	Inhibition von TLRs durch Chloroquin	99
3.5.3	Inhibition des Golgi-Apparates durch Monensin	101
4	Diskussion	103
4.1	Ergebnisüberblick	103
4.2	Ergebnisdiskussion	105
4.2.1	TRIM9: Ein provirales oder antivirales Protein?	105
4.2.2	TRIM9: Immunstimulation oder Immunsuppression?	109
4.2.3	Kritische Betrachtung der Methodik	114
4.3	Ausblick	115
4.4	Relevanzbeurteilung	115
5	Zusammenfassung	117
6	Summary	119

Appendix	121
Verzeichnis der Literatur	123
Verzeichnis der Abbildungen	133
Verzeichnis der Abkürzungen	137
Veröffentlichungen	140
Danksagungen	141

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Abschnittsüberblick	Seite
1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität	1
1.1.2 Antivirale Aktivität des angeborenen Immunsystems	2
1.1.2.1 Viren - parasitäre Partikel genetischen Materials	2
1.1.2.2 Mustererkennungsrezeptoren für virale RNA: <i>Toll-like</i> -Rezeptoren (TLR) und RIG-I- <i>like</i> -Rezeptoren (RLR)	3
1.1.2.3 Antivirale Immunantwort und Zytokininduktion	5

Immunität (röm. *immunis* - „frei sein von“) beschreibt im medizinischen Kontext die Resistenz des Körpers gegenüber pathogenen Einflüssen, insbesondere gegenüber Krankheitserregern. Das frühe Verständnis des Immunsystems, der Begriff Immunität sowie die Anfänge der Virologie sind eng mit ersten Versuchen des Impfens verbunden. Im Jahr 1733 beschrieb Voltaire in seinen philosophischen Briefen ein Verfahren der alten Chinesen des 15. Jahrhunderts, nach dem die schnupftabakähnliche Verwendung zerriebenen Schorfs von Pocken offenbar einen Schutz gegenüber einer Ansteckung mit der Pockenerkrankung verlieh [Schütt and Bröker, 2009; Voltaire, 1733]. Auch wenn seine alleinige Beteiligung an der erstmaligen Verwendung von Kuhpockenvakzinen umstritten ist, erlangte neben Edward Jenner insbesondere der englische Landwirt Benjamin Jetsy Berühmtheit: Er testete im Jahr 1774 erfolgreich Kuhpockenmaterial als Vakzine - an seiner eigenen Frau [Gross and Sepkowitz, 1998; Schütt and Bröker, 2009]. Mehr als 200 Jahre später wurde das Pockenvirus im Jahr 1978 von der Weltgesundheitsorganisation - maßgeblich bedingt durch ein konsequentes Impfprogramm - für ausgerottet erklärt.

1.1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Die Fähigkeit körperfremde von körpereigenen Strukturen zu unterscheiden bildet die Grundlage des humanen Immunsystems. Auf diese Weise kann physiologischerweise durch körperfremde Strukturen eine Immunantwort ausgelöst werden, während gegenüber körpereigenen Molekularstrukturen eine Immuntoleranz besteht. Eine adäquat ausgelöste Immunantwort ist dabei entscheidend, um die Integrität des Wirtsorganismus gegenüber bakteriellen, viralen oder parasitären Infektionen ebenso wie gegenüber der Entartung körpereigener Zellen zu wahren. Gegensätzlich erklären sich verschiedene Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises, deren Pathogenese durch eine überschießende Immunreaktion gegen körpereigenen Strukturen bedingt ist.

Auch wenn das Wissen über eine Vernetzung verschiedener Teile des Immunsystems massiv zunimmt und Teilbetrachtungen damit schwieriger werden, unterscheidet das klassische Erklärungsmodell nach wie vor zwischen der angeborenen und der phylogenetisch jüngeren, adaptiven Immunität.

Während die adaptive Immunantwort durch Ausdifferenzierung beziehungsweise Bildung antigenspezifischer Lymphozyten (zellulär) sowie Antikörper (humoral) ebenso wie durch die Aufrechterhaltung einer Gedächtnisfunktion im späteren Zeitverlauf einer Infektion oder bei einer Zweitinfektion an Wichtigkeit zunimmt, kommt dem angeborenen Teil des Immunsystems eine besondere Bedeutung hinsichtlich der initialen Immunantwort im Rahmen des Erstkontaktes mit Krankheitserregern zu. So werden dem angeborenen Immunsystem neben mechanischen Barrieren (Haut, Schleimhaut sowie von Schleimhäuten sezernierte, antimikrobielle Substanzen) insbesondere keimbahnkodierte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* - PRRs) zugerechnet, die evolutionär konservierte, Pathogen-assoziierte Molekularstrukturen (*pathogen associated molecular patterns* - PAMPs) erkennen und über die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege Einfluss auf Genexpressionsmuster und darüber auf die ausgelöste Immunantwort nehmen.

1.1.2 Antivirale Aktivität des angeborenen Immunsystems

1.1.2.1 Viren - parasitäre Partikel genetischen Materials

Im Gegensatz zu zellulären Krankheitserregern wie Bakterien oder Parasiten weisen Viren selbst weder eine intrinsische Replikationsfähigkeit noch einen eigenen Stoffwechsel auf. Viren stellen damit avitale, infektiöse Partikel genetischen Materials dar, die als extrazelluläre Virionen Wirtszellen infizieren können und sich als Viren intrazellulär unter parasitärer Ausnutzung des Wirtszellmetabolismus replizieren und dabei die Wirtszelle selbst schädigen können.

Auch wenn durch Viren ausgelöste Erkrankungen sehr viel länger bekannt waren, konnte erst Ende des 19. Jahrhunderts durch Adolf Mayer, Dimitri Ivanofsky und Martinus Beijerinck die Übertragbarkeit der Tabak-Mosaik-Krankheit durch bakteriologisch sterilen Pflanzensaft demonstriert werden, aus dem kein Erreger filtrierbar oder anzüchtbar erschien, dessen Infektiosität sich jedoch im Beisein lebender Pflanzenzellen steigerte. Die Isolation und der direkte Nachweis des Virus gelang erst etwa 40 Jahre später im Jahr 1935 [Bos, 1999].

Virale Replikationszyklen lassen sich grundsätzlich in verschiedene Abschnitte unterteilen: Die Adsorption eines Virus erfolgt durch Interaktion des Virus mit Oberflächenmolekülen der Wirtszelle, wodurch sich die Wirtszellspezifität vieler Viren erklären lässt. Der endozytotischen Aufnahme folgt das sogenannte *uncoating*, welches die intrazelluläre Freisetzung viraler Nukleinsäuren durch Zerfall des Viruskapsids beschreibt. Die anschließende Virusreplikation im engeren Sinne bezeichnet die Vervielfältigung der viralen Nukleinsäuren sowie die Proteinbiosynthese der davon kodierten, viralen Struktur- und Funktionsproteine. Dem intrazellulären Zusammenbau neuer Viruspartikel folgt anschließend entweder die Ausknospung (engl. *budding*) unter Mitnahme von Membranbestandteilen der Wirtszelle als Virushülle oder die Freisetzung unbehüllter Virionen durch Lyse der Wirtszelle.

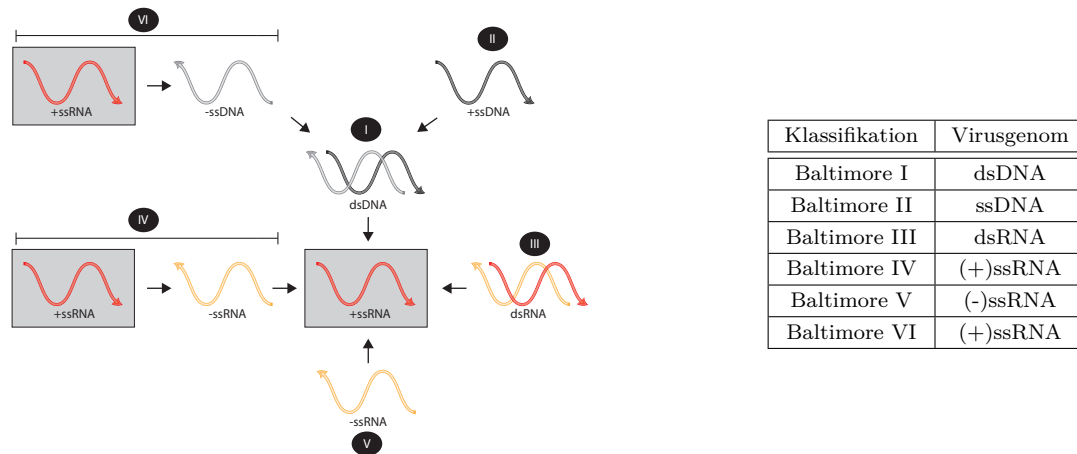


Abbildung 1.1.1: Die Einteilung von Viren nach der Baltimore-Klassifikation berücksichtigt neben der Art der viralen Nukleinsäuren ebenso die resultierenden Wege der viralen Proteinbiosynthese. Graphische Illustration gestaltet in Anlehnung an [Baltimore, 1971].

Die Vielzahl der heute bekannten Viren gruppiert sich anhand ihres molekularstrukturellen Aufbaus. Neben einer Unterteilung entsprechend der räumlichen Struktur des Viruskapsids oder dem Vorhandensein einer mit viralen Proteinen durchsetzten Lipid-Doppelschicht-Membran erfolgt die Klassifikation insbesondere nach der Art der viralen Nukleinsäuren. Entsprechend der Baltimore-Klassifikation lassen sich Viren so nach der Art ihres genetischen Materials unterteilen, das einzelsträngig (ss) oder als Doppelstrang (ds) hybridisiert in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) sowie im Fall von einzelsträngiger RNA positiv (+) als auch negativ (-) orientiert vorliegen kann [Baltimore, 1971]. Dabei können insbesondere DNA-Viren die Nukleinsäurepolymerasen der Wirtszelle zur eigenen Replikation sowie viralen Proteinsynthese nutzen. RNA-Viren benötigen hingegen eigene RNA-abhängige DNA-Polymerasen, um von deren Umschrieben in weiteren Schritten Wirtszellpolymerasen nutzen zu können oder verfügen alternativ über RNA-abhängige RNA-Polymerasen, um das virale Genom somit direkt replizieren zu können. Dem intrazellulären *uncoating* folgend können (+)ssRNA-Viren ihre genomische RNA direkt als *messenger*RNA (mRNA) für die ribosomale Proteinbiosynthese verwenden.

1.1.2.2 Mustererkennungsrezeptoren für virale RNA: *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) und *RIG-I-like-Rezeptoren* (RLR)

Das angeborene Immunsystem impliziert eine Vielzahl keimbahnkodierter, ubiquitär oder Zelltypspezifisch exprimierter PRRs, die evolutionär konservierte PAMPs von Krankheitserregern erkennen und darüber eine angemessene Immunantwort zum Schutz der Wirtsintegrität einleiten. Im Rahmen von Virusinfektionen stellen atypische Ribonukleinsäuren, die sich entweder in einem Strukturmerkmal oder ihrer Lokalisation von körpereigenen Nukleinsäuren unterscheiden, ein wichtiges PAMP dar, das sowohl von transmembranären als auch von zytosolischen PRRs erkannt wird [Akira et al., 2006]. Dabei wird durch intrazelluläre PRRs im Rahmen von Infektionen mit DNA-Viren insbesondere zytosolisch vorkommende dsDNA und im Rahmen von Infektionen mit RNA-Viren atypisch konfigurierte RNA im Zytosol erkannt [Goubau et al., 2013].

Mit *retinoic acid inducible gene-I* (RIG-I) als wichtigstem Vertreter stellen die ubiquitär exprimierten RIG-I-like-Helikasen (RLHs) wichtige zytosolische PRRs dar, die durch Detektion viraler RNA im Zytoplasma eine Immunantwort initiieren. Neben RIG-I werden ebenso die Proteine *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5) sowie *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) den RLHs zugeordnet [Rothenfusser et al., 2005; Takeuchi and Akira, 2009; Yoneyama et al., 2004]. Im Gegensatz zu LGP2 sind die RIG-I- sowie MDA5-aktivierenden Nukleinsäurestrukturen bisher besser charakterisiert: So scheint eine frei zugängliche 5'-Triphosphatmodifikation (durch posttranskriptionelle Modifikationen ist die Zugänglichkeit des 5'-Triphosphat-Endes wirtseigener, zytosolischer RNA beschränkt) sowie eine dem Triphosphat-Ende nahegelegene Doppelsträngigkeit von mindestens 10 Nukleotiden das von RIG-I erkannte PAMP darzustellen [Hornung et al., 2006; Schmidt et al., 2009]. Auf diese Weise erkennt RIG-I eine Virusinfektion durch Bindung während der Virusreplikation auftretender RNA im Zytosol unter anderem bei Infektionen mit dem *Vesicular stomatitis-Virus* (VSV) oder dem Sendai-Virus (SeV) [Kato et al., 2005; Rehwinkel et al., 2010]. Weniger detailliert verstanden sind bisher die von MDA5 erkannten PAMPs: So werden dsRNA produzierende Picornaviridae - wie beispielsweise das Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) oder das Mengo-Virus - ebenso wie synthetische Polyinosinpolycytosinsäure (pI:C) von MDA5 erkannt [Pichlmair et al., 2009; Takeuchi and Akira, 2010]. Somit werden von MDA5 wahrscheinlich längere Abschnitte doppelsträngiger RNA im Zytosol gebunden, die gegensätzlich zu (-)ssRNA-Viren insbesondere während der Replikation positiv polarisierter ssRNA-Viren entstehen [Weber et al., 2006]. Durch Aktivierung von RIG-I und MDA5 kommt es durch Interaktion ihrer CARD-Domänen mit dem auf der äußeren mitochondrialen Membran lokalisierten Adaptorprotein MAVS (*mitochondrial antiviral signaling*) zu dessen Aktivierung und zur Polymerisation mehrerer MAVS-Proteine. Der weitere Signalweg involviert eine Vielzahl verschiedener Proteine und mündet letztlich in der phosphorylierungsbedingten Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 sowie der Aktivierung und Kerntranslokation von NF- κ B, siehe Abb. 1.1.2 [Goubau et al., 2013].

Neben RLHs bilden *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) eine Gruppe weiterer, transmembranärer PRRs, deren Subtypen entweder in der äußeren Plasmamembran (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11) oder in Membranen intrazellulärer Vesikel (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) lokalisiert sind. Dabei kommt vor allem den in Membranen von Endosomen, Lysosomen und in Membranen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisierten TLRs eine Bedeutung hinsichtlich der Erkennung fremder beziehungsweise atypischer Nukleinsäuren zu [Kawasaki et al., 2011]. So stellt (endolysosomale) dsRNA (sowie pI:C als synthetisches Analogon) den Liganden von TLR3 dar, während endolysosomale ssRNA von TLR7 und TLR8 detektiert wird [Takeuchi and Akira, 2010]. Mit Ausnahme von TLR3 rekrutiert eine Vielzahl aktivierter TLRs das zytosolische Adaptorprotein MyD88, welches über nachgeschaltete Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF7 sowie NF- κ B führt. TLR3 bindet nach Aktivierung das Adaptorprotein TRIF und führt darüber zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 sowie NF- κ B, siehe Abb. 1.1.2 [Kawasaki et al., 2011].

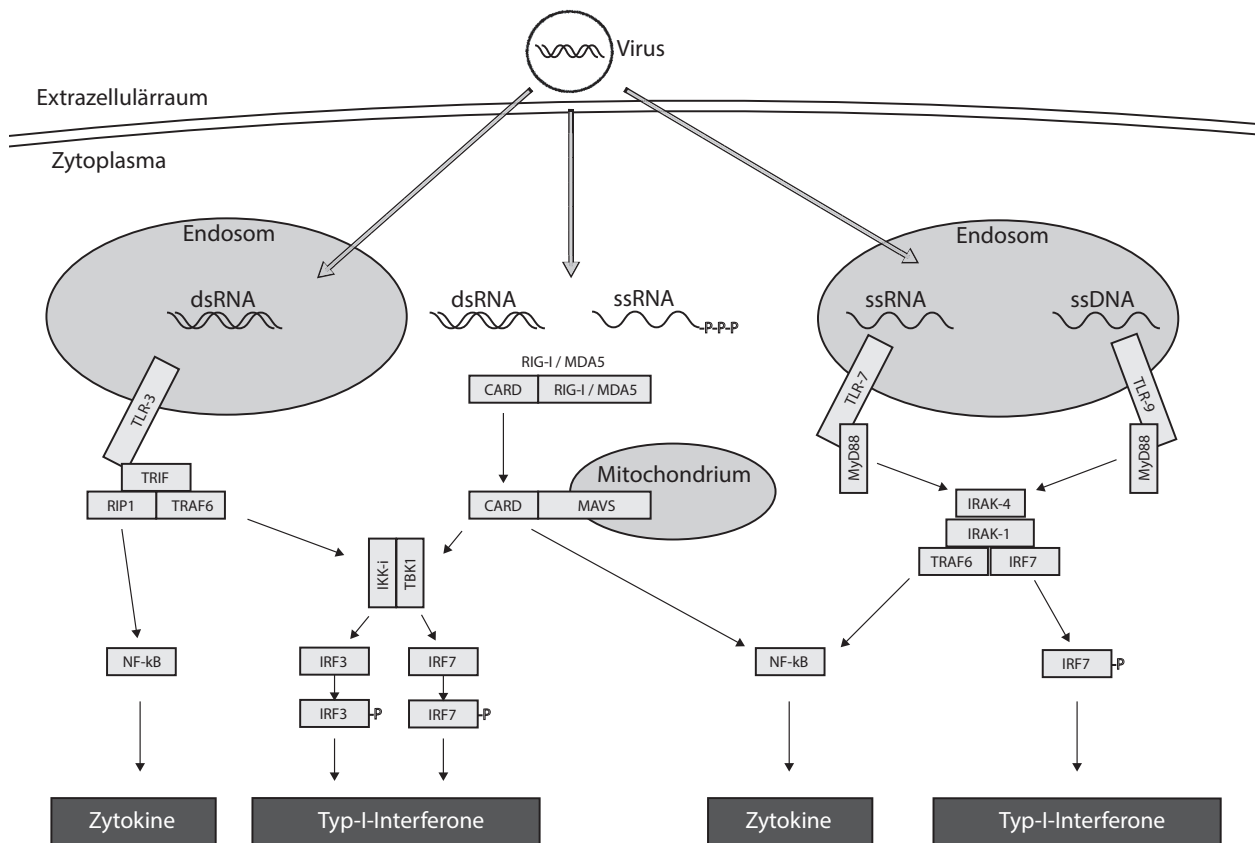


Abbildung 1.1.2: RLR- sowie TLR-induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

1.1.2.3 Antivirale Immunantwort und Zytokininduktion

Über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren beeinflussen PRRs die Genexpression und induzieren so verschiedene proinflammatorische Proteine, die ihrerseits entweder selbst als Zytokine oder Mediatoren zur Aufrechterhaltung und Regulation der Immunantwort beitragen oder direkt antivirale Wirkungen entfalten. Eine zentrale Stellung nimmt hierbei die Familie der Typ-I-Interferone ein - eine Gruppe sekretorischer Proteine, die in den Fünfzigerjahren als „mit Virusinfektionen interferierend“ beschrieben wurden und an den ubiquitär exprimierten IFN- α -Rezeptor (IFNAR) binden [Carrero, 2013; Isaacs and Lindenmann, 1957]. Der IFNAR seinerseits aktiviert den JAK-STAT-Signalweg, welcher zur Bildung des als Transkriptionsfaktor aktiven Komplexes *IFN-stimulated-gene-factor-3* (ISGF3) führt. So können durch Interferon stimulierbare Gene (ISGs) exprimiert werden, die in ihren Promotorregionen über ISGF3-bindende *interferon stimulated response elements* (ISRE) verfügen [Taylor and Mossman, 2013]. Zum einen amplifiziert Typ-I-Interferon damit die Immunantwort durch die Induktion diverser ISGs, welche antivirale Wirkungen mitunter über die Degradation viraler Nukleinsäuren oder die Inhibition der viralen Proteinsynthese entfalten [Yan and Chen, 2012]. Zum anderen induziert ISGF3 ebenso die Expression von IRF7, welches selbst wiederum als Transkriptionsfaktor die Expression von Typ-I-IFN steigert [Genin et al., 2003; Lu et al., 2000]. Diese Amplifikationskaskade trägt zur Aufrechterhaltung einer Typ-I-IFN-basierten Immunantwort bei.

1.2 *TRIPartite-Motif*-Proteine (TRIM)

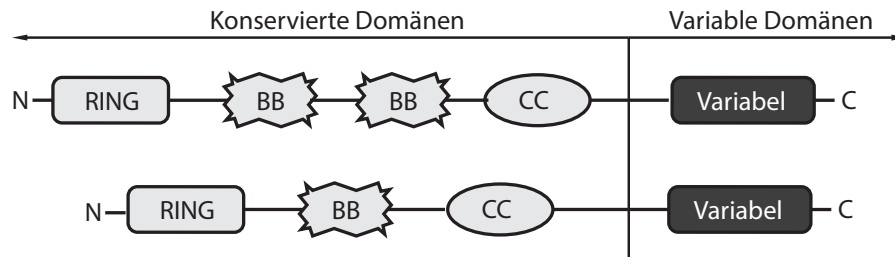
Abschnittsüberblick	Seite
1.2.1 Klassifikation der TRIM-Proteinfamilie	6
1.2.2 TRIM-Proteine: Regulatoren der antiviralen Immunität	7
1.2.3 TRIM9: Aktueller Stand der Literatur	8
1.2.3.1 TRIM9 im neurowissenschaftlichen Kontext	9
1.2.3.2 TRIM9 im immunologischen Kontext	9

1.2.1 Klassifikation der TRIM-Proteinfamilie

Die *Tripartite-motif*-Proteinfamilie (TRIM) enthält über 70 verschiedene Proteine, deren Zusammengehörigkeit sich über eine gemeinsame, konservierte Aminosäuresequenz am N-Terminus definiert. So verfügen alle TRIM-Proteine N-terminal über eine *Really-interesting-new-gene*-Domäne (RING), eine oder zwei *B-box*-Domänen (BB) sowie eine *Coiled-coil*-Domäne (CC), siehe Abb. 1.2.1. Wie Daten bezüglich anderer RING-Domänen enthaltender Proteine vermuten ließen, konnte inzwischen ebenso für einige TRIM-Proteine bestätigt werden, dass sie über eine von der RING-Domäne vermittelte E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität verfügen [Diaz-Griffero et al., 2006; Gack et al., 2007; Ishikawa et al., 2006; Lorick et al., 1999]. Ebenso wie bei der RING-Domäne handelt es sich bei den BB-Domänen um Zinkfingerdomänen, die in einigen TRIM-Proteinen (TRIM5 α und TRIM15) den von der PRY/SPRY-Domäne vermittelten Einfluss auf Virusinfektionen regulieren [Ozato et al., 2008]. Darüber hinaus konnten bei Patienten mit dem Hypertelorismus-Hypospadiе-Syndrom Mutationen in BB-Domänen von TRIM18 identifiziert werden [Trockenbacher et al., 2001]. Die CC-Domäne ist neben TRIM-Proteinen Bestandteil einer Vielzahl anderer Proteine und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen und damit die Entstehung hochmolekularer Proteinkomplexe [Ozato et al., 2008].

Entsprechend der Zusammensetzung ihrer variablen Proteindomänen am C-Terminus können die TRIM-Proteine nach Ozato et al. sowie Short und Cox weiterhin in Subgruppen unterteilt werden (siehe Abb. 1.2.1) [Ozato et al., 2008; Short and Cox, 2006]. Die in einer Vielzahl von Proteinen vorkommende Cos-Domäne vermittelt die Proteinbindung an Mikrotubuli [Short and Cox, 2006]. Die Domänen PRY sowie SPRY, die in TRIM-Proteinen sowohl einzeln als auch fusioniert vorkommen, werden als Bindungsdomänen für andere Proteine diskutiert [Ozato et al., 2008]. So konnte für TRIM5 α demonstriert werden, dass die PRY/SPRY-Domäne das virale Kapsid des Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) bindet [Sebastian and Luban, 2005].

Darüber hinaus wird entsprechend bioinformatischer Analysen die Mehrzahl aller TRIM-Proteine durch alternatives Spleißen in verschiedenen Isoformen exprimiert, wobei es bei etwa der Hälfte aller alternativen Isoformen zum Verlust einer oder mehrerer Proteindomänen kommt [Versteeg et al., 2013]. Die Expression einiger prognostizierter Spleißvarianten konnte inzwischen auch experimentell bestätigt werden [Cuchet et al., 2011; Gack et al., 2008; Qin et al., 2016].



Subgruppe	TRIM-Proteine	Variable Domänen
I	1,9,18,36,46,67	COS-FN3-PRY/SPRY
II	54,55,63	COS
III	42	COS-FN3
IV	4-7,10,11,15,17,21, 22,25-27,34,35,38,39,41,43,47-50,53,58,60,62,64,65,68,69,72,75	PRY/SPRY
V	8,19,31,40,52,56,61,73,74	-
VI	24,28,33	PHD-BR
VII	2,3,32,71	Filamin-NHL
VIII	37	MATH
IX	23	ARF
X	45	Filamin
XI	13,59	TM

Abbildung 1.2.1: Klassifikation der TRIM-Proteinfamilie. Alle TRIM-Proteine verfügen über einen gemeinsamen, konservierten N-Terminus, der für TRIM-Proteine der Subgruppen II, VIII sowie XI um eine BB-Domäne verkürzt ist. Tabelle: Anhand der variablen C-terminalen Proteindomänen lassen sich TRIM-Proteine nach Versteeg et al. in Subgruppen unterteilen [Versteeg et al., 2013].

1.2.2 TRIM-Proteine: Regulatoren der antiviralen Immunität

Durch Publikationen der letzten Jahre zeigte sich, dass eine Vielzahl verschiedener TRIM-Proteine im Rahmen der angeborenen Immunantwort und deren Regulation eine Rolle spielt. So konnte nach Rajsbaum et al. für 17 von 28 getesteten TRIM-Genen eine gesteigerte Expression im Rahmen einer Infektion mit Influenza-Viren oder im Rahmen einer TLR-Induktion demonstriert werden [Ozato et al., 2008; Rajsbaum et al., 2008]. Für TRIM5 α , TRIM22 und TRIM19 konnte eine direkte Typ-I-IFN-abhängige Expression gezeigt werden, wobei in der Promotorregion von TRIM5 eine ISRE-Region nachgewiesen werden konnte [Asaoka et al., 2005; Barr et al., 2008; Regad et al., 2001; Sakuma et al., 2007].

Hinsichtlich der Proteinfunktionen selbst konnten TRIM-Proteine sowohl als direkte (retro-)virale Restriktionsfaktoren wie auch als Regulatoren antiviraler Signalwege identifiziert werden. Dabei ist häufig die von der RING-Domäne vermittelte Ubiquitin-Ligase-Aktivität involviert. So wird durch K48-verkettete Polyubiquitinierung entweder der proteasomale Abbau von Zielmolekülen induziert oder deren Aktivität beziehungsweise Lokalisation wird durch atypische Polyubiquitinierungen beeinflusst [Davis and Gack, 2015]. Darüber hinaus wurde ebenso demonstriert, dass von TRIM-Proteinen (TRIM6) synthetisierte, unverankerte Polyubiquitinketten zur Induktion einer Typ-I-IFN-basierten Immunantwort beitragen [Rajsbaum et al., 2014].

Als Beispiel für ein direkt als Restriktionsfaktor aktives TRIM-Protein induziert TRIM79 α durch Ubiquitinierung den proteasomalen Abbau viraler Polymerasen und wirkt so als Restriktionsfaktor des *Tick-borne-encephalitis*-Virus [Taylor et al., 2011]. TRIM19 wurde als Restriktionsfaktor im Rahmen von Infektionen mit HIV-1, Lassafieber, Influenza-A sowie Ebola identifiziert [Chelbi-Alix et al., 1998; Nisole et al., 2005; Turelli et al., 2001]. Diverse andere TRIM-Proteine werden als Restriktionsfaktoren verschiedener Abschnitte des retroviralen Replikationszyklus, insbesondere bezüglich HIV diskutiert: Dabei interagiert TRIM5 α mit dem HI-Viruskapsid und blockiert so das *uncoating*, TRIM11, TRIM32 sowie TIM22 supprimieren die virale Genexpression und TRIM22 sowie TRIM15 inhibieren den Zusammenbau neuer Viruspartikel [Barr et al., 2008; Javanbakht et al., 2006; Nisole et al., 2005; Ozato et al., 2008; Uchil et al., 2008].

Neben der Rolle als direkte Restriktionsfaktoren agieren TRIM-Proteine weiterhin als Regulatoren verschiedener Signalwege der angeborenen antiviralen Immunabwehr. So konnten Versteeg et al. durch ein systematisches Screening für etwa die Hälfte aller TRIM-Proteine einen regulativen Einfluss auf die Typ-I-IFN-basierte Immunantwort demonstrieren [Versteeg et al., 2013]. Dabei hatten, mit Ausnahme von TRIM46, alle TRIM-Proteine der Subgruppe I (TRIM1/9/18/36/67) einen fördernden Einfluss auf die Promotoraktivitäten von Typ-I-Interferon sowie von ISRE-Elementen [Versteeg et al., 2013]. Die verantwortlichen Molekularmechanismen sind dabei jedoch bisher nur für wenige, unter anderem für folgende TRIM-Proteine ansatzweise verstanden: So katalysiert das durch Typ-I-IFN-induzierbare TRIM25 beispielsweise eine K63-verkettete-Polyubiquitinierung der CARD-Domänen von RIG-I, worüber die Wechselwirkung zwischen RIG-I und MAVS und damit das weitere *downstream-signaling* gefördert werden [Gack et al., 2007]. Eine ähnliche Funktion wird ebenso für TRIM4 diskutiert [Yan et al., 2014]. TRIM13 hingegen inhibiert die MDA5-induzierte Immunantwort [Narayan et al., 2014], mutmaßlich über eine K48-verkettete-Polyubiquitinierung und den so induzierten, proteasomalen Abbau von MDA5 [Davis and Gack, 2015]. Für TRIM44 (ein atypisches TRIM-Protein ohne eine RING-Domäne) konnte kürzlich wiederum gezeigt werden, dass es den K48-Polyubiquitin-induzierten Abbau von MAVS blockiert und damit einen fördernden Einfluss auf das RLR-Signal hat [Yang et al., 2013]. Weiterhin wurde für einige TRIM-Proteine ein aktivierender oder inhibitorischer Einfluss auf die Typ-I-IFN-induzierenden Transkriptionsfaktoren beschrieben: So wird IRF3 beispielsweise von TRIM21 stabilisiert [Yang et al., 2009], TRIM30 α hat einen inhibitorischen Einfluss auf NF- κ B [Shi et al., 2008] und TRIM27 scheint sowohl die Aktivierung von IRF3 als auch von NF- κ B zu inhibieren [Ozato et al., 2008].

1.2.3 TRIM9: Aktueller Stand der Literatur

TRIM9 gehört entsprechend der variablen Domänen am C-Terminus zur Subgruppe I der TRIM-Proteine und wird nach Qin et al. in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert, siehe Abb. 1.2.2 [Qin et al., 2016]. Durch alternatives Spleißen entsteht die um die PRY/SPRY-Domäne verkürzte Isoform TRIM9s. Dabei werden nach Qin et al. beide Isoformen ubiquitär exprimiert, unter anderem in der Leber, Milz, Lunge, in PBMCs (*peripher blood mononuclear cells*) sowie in diversen, üblicherweise verwendeten Zelllinien (unter anderem A549, HEK293) [Qin et al., 2016].

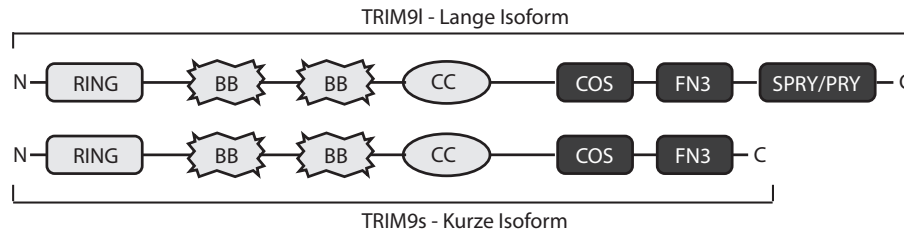


Abbildung 1.2.2: TRIM9 wird durch alternatives Spleißen nach Qin et al. in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert [Qin et al., 2016]. Die kurze Isoform (TRIM9s, Länge: 550 Aminosäuren) entsteht durch Wegfall der SPRY/PRY-Domäne aus der langen Isoform (TRIM9l, Länge: 710 Aminosäuren).

Für TRIM9 wurden vereinzelt Funktionen im neurowissenschaftlichen Kontext sowie zuletzt zunehmend regulative Einflüsse auf immunologische Signalwege beschrieben.

1.2.3.1 TRIM9 im neurowissenschaftlichen Kontext

Tanji et al. demonstrierten, dass die neuronale Expression von TRIM9 im Rahmen der Parkinson-Erkrankung sowie der Lewy-Body-Demenz supprimiert ist [Tanji et al., 2010]. Winkle et al. beschrieben weiterhin einen Einfluss von TRIM9 auf die neuroembryonale Entwicklung axonaler Verästelungen durch Inhibition SNARE-Komplex-abhängiger Exozytose: Als zugrunde liegender Molekularmechanismus wurde dabei eine Interaktion zwischen TRIM9 und SNAP25 beschrieben [Winkle et al., 2014]. SNAP25, welches durch die Bindung an TRIM9 kompetitiv inhibiert wird, ist dabei als t-SNARE-Protein wirksam und als solches für die Membranfusion im Kontext exozytotischer Prozesse zuständig [Winkle et al., 2014].

1.2.3.2 TRIM9 im immunologischen Kontext

In Publikationen der letzten Jahre wurden für TRIM9 weiterhin sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte beschrieben und dafür verantwortliche molekulare Mechanismen postuliert¹.

So demonstrierten Carthagen et al. neben einer geringgradigen Suppression der TRIM9-Expression durch Interferon- γ insbesondere eine Hochregulation der TRIM9-Expression in Makrophagen durch Stimulation mit Immunkomplexen [Carthagen et al., 2009].

Durch ein breites *screening* rückte TRIM9 (hier nur TRIM9l betrachtet) erstmals 2013 als potenziell proinflammatorisches Protein in den immunologischen Fokus: So konnten Versteeg et al. durch *Loss-of-function*-Experimente mittels *small-hairpin*-RNAs (shRNA) einen fördernden Einfluss von TRIM9 auf die Sendai-Virus-induzierte Expression von Interferon- β sowie eine durch transiente Überexpression von TRIM9 induzierte ISRE-Aktivität demonstrieren [Versteeg et al., 2013].

¹Die experimentellen Daten dieser Arbeit wurden im Zeitraum von März 2014 bis Mai 2015 erhoben. Die Publikationen Shi et al. sowie Qin et al. sind während beziehungsweise nach dieser Zeit veröffentlicht worden und beschreiben erstmals auf molekularer Ebene die Rolle von TRIM9 während Virusinfektionen [Qin et al., 2016; Shi et al., 2014]. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung ist daher ebenso wie die experimentelle Herangehensweise von diesen Publikationen unberührt. Nichtsdestotrotz werden die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse im Kontext der später erschienenen Publikationen diskutiert.

Kurze Zeit später legten Shi et al.¹ gegensätzlich einen immuninhibierenden Charakter von TRIM9 (hier nur TRIM9l betrachtet) durch Suppression der Aktivität von NF- κ B nahe: Demnach interagiert TRIM9 nach Phosphorylierung seiner Serine an Aminosäureposition 76 und 80 mit β -TrCP, einem Protein, welches als Teil eines Multiproteinkomplexes mit Ubiquitinligaseaktivität unter anderem für die Erkennung von I κ B sowie NF- κ B2 (p100) und darüber für die Initiation deren proteasomalen Abbaus beziehungsweise deren proteasomaler Prozessierung zuständig ist [Shi et al., 2014]. Durch die kompetitive Hemmung dieser Erkennung durch die Interaktion zwischen TRIM9 und β -TrCP blockiert TRIM9 effektiv die Aktivierung und Kerntranslokation von NF- κ B. Damit liegt entsprechend dieser Studie eine antiinflammatorische Funktion von TRIM9l nahe, siehe Abb. 1.2.3 [Shi et al., 2014].

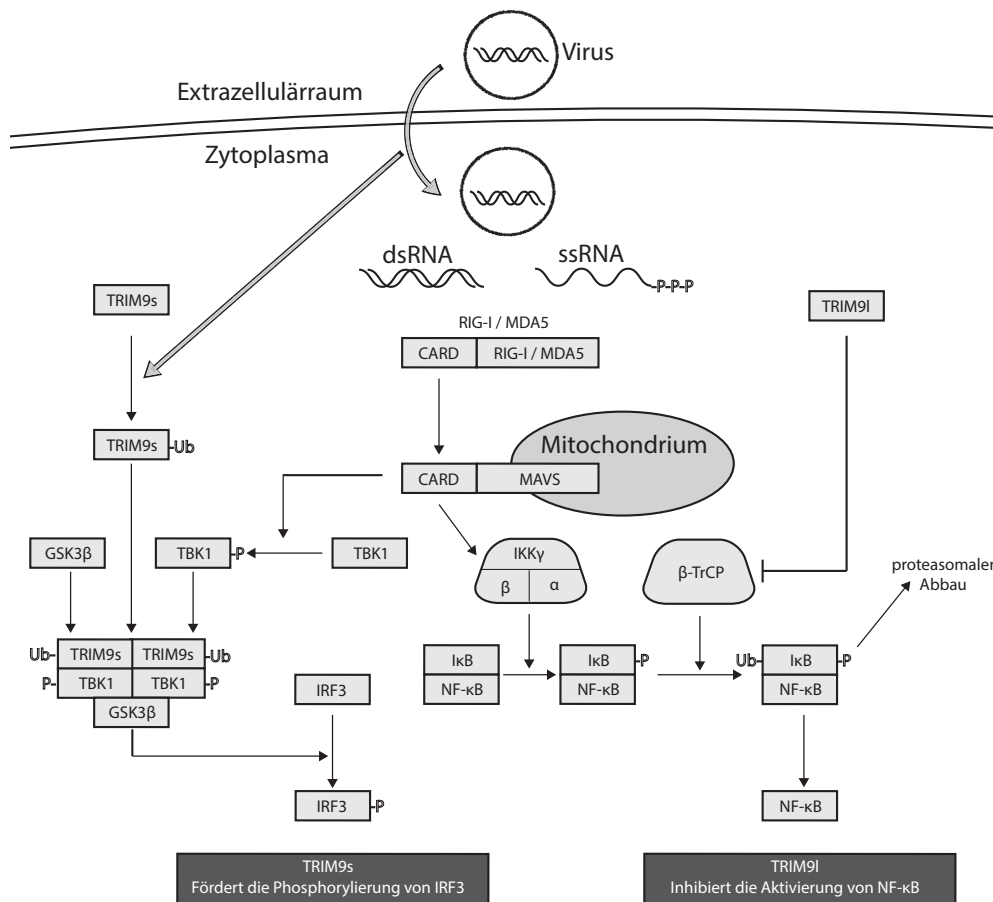


Abbildung 1.2.3: Aktuelles Erklärungsmodell: Beeinflussung der Aktivierung von NF- κ B und IRF3 durch die kurze sowie lange Isoform von TRIM9 im Rahmen von Virusinfektionen. Graphische Illustration der nach Qin et al. sowie Shi et al. beschriebenen Funktionen von TRIM9 [Qin et al., 2016; Shi et al., 2014].

Kürzlich wurde TRIM9s weiterhin durch Qin et al.¹ als antivirales, proinflammatorisches Protein beschrieben [Qin et al., 2016]. Demnach kommt es im Rahmen von Virusinfektionen zu einer Auto-

¹Die experimentellen Daten dieser Arbeit wurden im Zeitraum von März 2014 bis Mai 2015 erhoben. Die Publikationen Shi et al. sowie Qin et al. sind während beziehungsweise nach dieser Zeit veröffentlicht worden und beschreiben erstmals auf molekularer Ebene die Rolle von TRIM9 während Virusinfektionen [Qin et al., 2016; Shi et al., 2014]. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung ist daher ebenso wie die experimentelle Herangehensweise von diesen Publikationen unberührt. Nichtsdestotrotz werden die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse im Kontext der später erschienenen Publikationen diskutiert.

polyubiquitinierung von TRIM9s, welches in dieser Form als verbindende Plattform zwischen TBK1 und GSK3 β wirkt und darüber die phosphorylierungsbedingte Aktivierung von IRF3 fördert (siehe Abb. 1.2.3). Der antivirale sowie proinflammatorische Mechanismus konnte dabei ausschließlich für TRIM9s, nicht jedoch für TRIM9l demonstriert werden [Qin et al., 2016].

Nach aktuellem Wissensstand wirkt TRIM9 damit während Virusinfektionen als ausbalancierender Faktor zwischen der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B sowie IRF3 und beeinflusst darüber die antivirale Immunantwort (siehe Abb. 1.2.3).

1.3 Vorarbeiten

Abschnittsüberblick	Seite
1.3.1 Korrelation eines Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) der 3'UTR von TRIM9 mit dem Ausgang einer Hepatitis-C-Virus-Infektion	11
1.3.2 TRIM9- <i>knock-down</i> : Inhibition der RLR-induzierten Immunantwort	13

1.3.1 Korrelation eines Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) der 3'UTR von TRIM9 mit dem Ausgang einer Hepatitis-C-Virus-Infektion

Die zu erwartende Wahrscheinlichkeit einer Spontanausheilung nach akuter Hepatitis-C-Virus-Infektion (HCV-Infektion) kann nach Micallef et al. mit circa 26 Prozent beziffert werden und wird dabei beeinflusst von diversen Faktoren wie Geschlecht, ethnischer Abstammung, relevanten Begleiterkrankungen, Infektionsdosis und viralem Genotyp sowie verschiedenen genetischen Polymorphismen des Wirts [Grebely et al., 2007; Lehmann et al., 2004; Micallef et al., 2006]. So konnten entsprechend folgender Publikationen unter anderem genetische Polymorphismen in Bereichen der Gene TLR3 [Geng et al., 2016], MDA5 [Hoffmann et al., 2015], IL-28B [Thomas et al., 2009] sowie IFN- γ [Huang et al., 2007] mit jeweils durch die SNP-Allele differentiell beeinflussten Wahrscheinlichkeiten einer HCV-Spontanausheilung assoziiert werden.

Durch eine Kooperationsgruppe² konnten nun im Rahmen einer genomweiten Assoziationsstudie auf Basis der deutschen HCV-(1b)-Anti-D-Kohorte die Allele eines Einzelnukleotidpolymorphismus der TRIM9-3'UTR (SNP rs12879906, Basenposition 1379 der TRIM9-3'UTR) mit differentiellen Chronifizierungsraten einer HCV-Infektion korreliert werden. Der Ursprung des zugrundeliegenden Patientenkollektivs geht auf eine iatrogene HCV-Infektion von Frauen im Rahmen einer Anti-D-Immunprophylaxe in der Deutschen Demokratischen Republik in den Jahren 1978 und 1979 zurück. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund der ausgeprägten Homogenität der Kohorte hinsichtlich des Alters, Geschlechts und der Infektionsdosis interessant sowie dem inzwischen knapp

²Die SNP-Assoziationsanalyse wurde durch die Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Protzer durchgeführt (Institut für Virologie der Technischen Universität München).

vierzigjährigen Beobachtungszeitraum, innerhalb dessen die Kohorte, bedingt durch die bekannte Infektionsquelle, prospektiven Studien zugeführt werden konnte [Wiese et al., 2014].

TRIM9-3'UTR-SNP rs12879906	Homozygot „G/C“ n=223	Heterozygot n=31	Homozygot „A/T“ n=7	Summe n=261
Chronifizierung [n]	173	13	5	191
Spontanausheilung [n]	50	18	2	70
Ausheilungsrate [%]	22,4	58	28,5	26,8

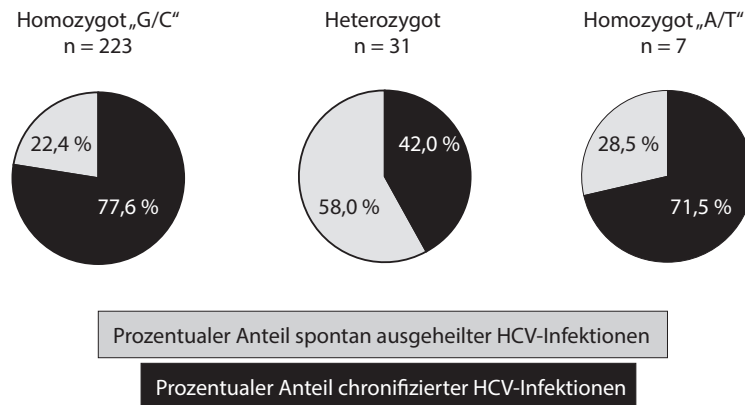


Abbildung 1.3.1: Ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) in der TRIM9-3'UTR ist mit einem differentiellen Ausgang einer HCV-Infektion assoziiert (SNP *reference* rs12879906, Basenposition 1379 der TRIM9-3'UTR). Die hinsichtlich des SNPs heterozygote Subgruppe weist mit 58 Prozent einen höheren Anteil spontan ausgeheilter HCV-Infektionen verglichen mit der homozygoten („G/C“) Vergleichspopulation auf.

Im Rahmen der erwähnten Assoziationsstudie² wurde ein Subkollektiv von 261 HCV-Patientinnen der Anti-D-Kohorte, innerhalb derer die individuellen Verläufe hinsichtlich der HCV-Chronifizierung bekannt sind, genotypisiert. Das hier analysierte Subkollektiv betrachtend ist eine Ausheilungsrate von 26,8 Prozent entsprechend einem Anteil chronischer Infektionen von 73,2 Prozent (191 von 261 Patientinnen) festzustellen. Dies stimmt mit nach Literatur zu erwartenden Chronifizierungsraten überein, die stark studienabhängig mit 50-80 Prozent beschrieben werden. Die 31 Primärstudien betrachtende Metaanalyse von Micallef et al. bezifferte die HCV-*clearance* mit 26 Prozent - dies entspricht einer Chronifizierung von 74 Prozent und damit jener des hier betrachteten Patientenkollektivs [Micallef et al., 2006].

Hinsichtlich des SNPs der TRIM9-3'UTR ist innerhalb der homozygoten („G/C“) Subgruppe, welche den Genotyp der höchsten Prävalenz widerspiegelt, eine Chronifizierungsrate von 77,6 Prozent der HCV-Infektionen festzustellen. Innerhalb der hinsichtlich des SNPs heterozygoten Subgruppe chronifizierten mit 42,0 Prozent hingegen nur weniger als die Hälfte der HCV-Infektionen (siehe Abb. 1.3.1). Unter Vernachlässigung der homozygoten („A/T“) Subgruppe bei geringer genotypischer Prävalenz und Fallzahl (n=7) entsteht daher der Eindruck, dass die im Rahmen des SNPs auftretende Basenpaarung „A/T“ einen protektiven Einfluss auf den Verlauf einer HCV-Infektion ausübt.

²Die SNP-Assoziationsanalyse wurde durch die Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Protzer durchgeführt (Institut für Virologie der Technischen Universität München).

1.3.2 TRIM9-*knock-down*: Inhibition der RLR-induzierten Immunantwort

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe³ haben gezeigt, dass der *knock-down* von TRIM9 durch zwei verschiedene siRNAs die RLR-induzierte sowie die von Viren (*Vesicular-stomatitis-Virus*, *Semliki-forest-Virus*, Sendai-Virus) induzierte Sekretion von IP-10 (*interferon gamma induced protein 10*, CXCL10) supprimiert. So konnte der nach Versteeg et al. publizierte Effekt einer durch den *knock-down* (shRNA) von TRIM9 inhibierten, Sendai-Virus-induzierten Immunantwort (die Induktion von Interferon- β und ISG-54 quantifizierend) auf die Immunantwort nach RLR-Aktivierung durch synthetische Liganden (Polyinosin-Polycytosin-Säure, Triphosphat-RNA) übertragen werden [Versteeg et al., 2013]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass TRIM9 einen positiv-regulierenden Einfluss auf das *downstream-signaling* RIG-I-ähnlicher-Rezeptoren hat.

1.4 Arbeitshypothese und Fragestellung

In den vergangenen Jahren haben sich eine Vielzahl verschiedener TRIM-Proteine als Regulatoren der antiviralen Immunität herauskristallisiert (siehe Abschnitt 1.2.2). Durch eine Kooperationsgruppe konnte ein genetischer Polymorphismus in der Umgebung des TRIM9-Gens mit einer entsprechend der SNP-Allele differentiellen Wahrscheinlichkeit einer HCV-Chronifizierung assoziiert werden (siehe Abschnitt 1.3.1). Die zum Zeitpunkt der experimentellen Datenerhebung dieser Arbeit verfügbare Literatur¹ ließ außerdem eine immunstimulatorische Funktion von TRIM9 im Rahmen von Virusinfektionen vermuten [Versteeg et al., 2013]. Diese Vermutung wurde durch erste Vorarbeiten der Arbeitsgruppe - insbesondere im Zusammenhang von RLR-induzierten Immunantworten - erhärtet (siehe Abschnitt 1.3.2).

Auf Basis dieser verfügbaren Vorergebnisse wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass der die HCV-Ausheilung beeinflussende SNP in der 3'UTR von TRIM9 ein verändertes Expressionsniveau von TRIM9 bedingt, und die Menge an TRIM9 in einer Zelle Einfluss auf die durch ssRNA-Viren induzierte Immunantwort sowie möglicherweise auf die Virusreplikation nimmt.

Auf Basis dieser Hypothese untersucht die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

- Hat der SNP in der 3'UTR des TRIM9-Gens einen Einfluss auf die Expressionsstärke des davon kodierten Proteins?
- Beeinflusst die Expression von TRIM9 die Replikation von Positiv- und Negativ-Strang-ssRNA-Viren?
- Moduliert TRIM9 dabei Signalwege der angeborenen Immunität?

¹Die experimentellen Daten dieser Arbeit wurden im Zeitraum von März 2014 bis Mai 2015 erhoben. Die Publikationen [Shi et al., 2014] sowie [Qin et al., 2016] sind während beziehungsweise nach dieser Zeit veröffentlicht worden und beschreiben erstmals auf molekularer Ebene die Rolle von TRIM9 während Virusinfektionen. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung ist daher ebenso wie die experimentelle Herangehensweise von diesen Publikationen unberührt. Nichtsdestotrotz werden die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse im Kontext der später erschienenen Publikationen diskutiert.

³Die erwähnten Vorergebnisse sind Teil der Promotion von Sofía Antón.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und allgemeine Verbrauchsmittel

Abschnittsüberblick	Seite
2.1.1.1 Geräte	15
2.1.1.2 Bestellbare Extraktions- und Analyse- <i>kits</i>	16
2.1.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmittel	16
2.1.1.4 Puffer, Lösungen und Medien	19

2.1.1.1 Geräte

Mithras LB940 <i>Microplate Reader</i>	Fa. Berthold Technologies, Bad Wildbad (D)
Thermo <i>Cycler</i> T3	Fa. Biometra, Göttingen (D)
Light <i>Cycler</i> 480 II	Fa. Roche, Basel (CH)
Durchflusszytometer FACSCalibur	Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)
Alpha <i>Imager</i>	Fa. Alpha Innotech, San Leandro (USA)
UV-Transilluminator	Fa. LKB Bromma, Schweden
Lichtmikroskop Axio Vert25	Fa. Zeiss, Oberkochen (D)
Fluoreszenzmikroskop Axio Vert.A1	Fa. Zeiss, Oberkochen (D)
Konfokales Mikroskop Leica TCS SP5	Fa. Leica, Wetzlar (D)
NanoDrop 2000c <i>Spectrophotometer</i>	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Image Reader</i> LAS-4000	Fa. Fujifilm, Minato (Japan)
Spannungsquelle PowerPac Basic/PAC200	Fa. Biorad, Hercules (USA)
CO ₂ -Begasungsbrutschrank BBD 6220	Fa. Heraeus, Hanau (D)
Wärmeschrank B290	Fa. Heraeus, Hanau (D)
<i>Thermoshake</i>	Fa. Gerhardt, Königswinter (D)
<i>Laminar Air Flow</i> Werkbank HB 2472 S	Fa. Heraeus, Hanau (D)
Eismaschine	Fa. Manitowoc, Manitowoc (USA)
Vortexer	Fa. Scientific Industries, New York (USA)
Thermomixer <i>compact/comfort</i>	Fa. Eppendorf, Hamburg (D)
Wasser-Inkubationsbad	Fa. GFL, Burgwedel (D)
Zentrifuge gekühlt 5415R	Fa. Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge 5424	Fa. Eppendorf, Hamburg (D)
Heraeus Multifuge 3L-R	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)

Waage	Fa. Sartorius Industries, Göttingen (D)
Dampfsterilisator Varioklav	Fa. HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim (D)
Durchflussszytometer BD FACSCALIBUR	Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)

2.1.1.2 Bestellbare Extraktions- und Analyse-*kits*

NucleoBond Xtra Maxi Plus EF	Fa. Macherey-Nagel, Düren (D)
GeneJET <i>Plasmid Miniprep Kit</i>	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
QuickExtract TM <i>DNA Extraction Solution</i>	Fa. Epicentre, Madison (USA)
peqGOLD <i>Total RNA Kit</i>	Fa. Peqlab, Erlangen (D)
peqGOLD Gel <i>Extraction Kit</i>	Fa. Peqlab, Erlangen (D)
Humanes IP-10 ELISA <i>Set</i>	Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)
Humanes Interleukin-6 ELISA <i>Set</i>	Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)
Humanes TNF- α ELISA <i>Set</i>	Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)
DC TM <i>Protein Assay</i>	Fa. Biorad, Hercules (USA)
BD OptEIA ELISA Substrat	Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)
SensoLyte pNPP <i>Secreted Alkaline Phosphatase Reporter Gene Assay</i> „Luminometric“	Fa. ANASPEC/EGT, Freemantle (USA)

2.1.1.3 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Enzyme-linked immunosorbent assay

Natriumhydrogencarbonat NaHCO_3	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Natriumcarbonat Na_2CO_3	Fa. Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid NaOH	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Fa. Lonza, Basel (CH)
Tween-20	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Schwefelsäure	Klinikapotheke, München (D)
Tetramethylbenzidin / Hydrogenperoxid	Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)

Western-blot

Acrylamidstammlösung (30 %)	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Protease Inhibitor Cocktail P8340	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Tetramethylethyldiamin	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Ammonium Persulfat (10 %)	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
2-Mercaptoethanol	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Bromphenolblau	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Glycerol	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Methanol	Fa. Merck, Darmstadt (D)
Tromethamin (TRIS)	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Dithiothreitol	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Tween-20	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Milchpulver	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Bovines Serum Albumin	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Transferrmembran, Porengröße 45 μm	Fa. Merck, Darmstadt (D)
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
SuperSignal West Femto Sensitivity Substrate	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)

Agarose-Gelelektrophorese

LE-Agarose	Fa. Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf (D)
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
OGene <i>Ruler DNA Ladder Mix</i>	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
6x DNA <i>Loading Dye</i>	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)

Dualer Luciferase-assay

Tricine	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Fa. Merck, Darmstadt (D)
EDTA, ph 8.0	Fa. USB Corporation, Cleveland (USA)
Dithiothreitol	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
ATP	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Acetyl-Coenzym A - Trilithiumsalz	Fa. AppliChem, Gatersleben (D)
Natriumhydroxid	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Magnesiumcarbonathydroxid	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Luciferin	Fa. Biosynth AG, Staad (CH)
Coelenterazin	Fa. Promega, Madison (USA)
<i>Passive Lysis Buffer</i> 5x	Fa. Promega, Madison (USA)

Zellkultur

<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Fa. Lonza, Basel (CH)
L-Glutamin	Fa. Lonza, Basel (CH)
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
Ciprofloxacin	Fa. Fresenius, Bad Homburg (D)
Tryptose-Phosphat-Broth-Lösung (29,5 g/l)	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Fa. Lonza, Basel (CH)
Natriumchloridlösung (0,9 %)	Fa. B. Braun, Melsungen (D)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin 10x	Fa. Lonza, Basel (CH)

Transfektionsreagenzien

Opti-MEM	Fa. Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
Lipofectamine-2000	Fa. Invitrogen, Carlsbad (USA)
RNAiMax	Fa. Invitrogen, Carlsbad (USA)
<i>GeneJuice</i>	Fa. Merck Novagen, Darmstadt (D)
TransIT-X2	Fa. Mirus, Madison (USA)
TransIT-LT1	Fa. Mirus, Madison (USA)

Enzyme

Alle Enzyme wurden in Kombination mit den mitgelieferten Puffern verwendet. Im Falle der zeitgleichen Verwendung mehrerer Restriktionsenzyme erfolgte die Auswahl des Puffers gemäß der Plattform „DoubleDigest“ (Fa. ThermoScientific).

Phusion <i>High-Fidelity</i> Polymerase	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Reverse Transkriptase	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
T7-Endonuklease I	Fa. New England Biolabs, Ipswich (USA)
T4-DNA-Ligase	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Restriktionsenzym FSEI	Fa. New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsenzym ASCI	Fa. New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsenzym BAMHI	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Restriktionsenzym EcoRI	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Alkalische Phosphatase	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Trypsin 10x	Fa. Lonza, Basel (CH)

Sonstiges

RNAse-Inhibitor Riboblock	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Oligo(dT)- <i>primer</i>	Fa. Metabion, Martinsried (D)
KAPA <i>Probe Fast Universal</i> (qRT-PCR)	Fa. Peqlab, Erlangen (D)
Desoxynucleotidtriphosphate	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
LB-Medium / LB-Agar	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Ampicillin	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Manganchlorid-Tetrahydrat	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Calciumchlorid-Dihydrat	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Kaliumchlorid	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
PIPES	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (D)
Hoechst33342 200 µg/ml	Fa. ImmunoChemistry, Bloomington (USA)
VECTASHIELD Eindeckmediumµg/ml	Fa. Vector Laboratories, Burlingame (CA)

2.1.1.4 Puffer, Lösungen und Medien**Zellkultur**

<u>DMEM-Vollmedium</u>	<u>BHK-Medium</u>
10 Vol.% FCS	10 Vol.% FCS
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
10 mg/l Ciprofloxacin	10 mg/l Ciprofloxacin
in DMEM	1 Vol.% Tryptosephosphat-Lösung (29,5 g/l)
	in DMEM

Bakterienkultur

<u>LB-Medium</u>	<u>LB-Selektionsmedium</u>	<u>Inoue-Transformations-Puffer</u>
10 g/l Trypton	LB-Medium	55 mM Manganchlorid-Tetrahydrat
5 g/l Hefeextrakt	100 mg/l Ampicillin	15 mM Calciumchlorid-Dihydrat
10 g/l NaCl		250 mM KCl
in Wasser		10 mM PIPES (0.5 M, pH 6,7)
		in Wasser

Western-blot

<u>Laufpuffer (1x)</u>	<u>Transferpuffer (1x)</u>	<u>TBST-Puffer (1x)</u>
192 mM Glycin	100 mM Glycin	50 mM Tromethamin (TRIS)
25 mM Tromethamin (TRIS)	10 mM Tromethamin (TRIS)	150 mM Natriumchlorid
3,47 mM Natriumlaurylsulfat	20 Vol.% Methanol	0,1 Vol.% Tween-20
in Wasser	in Wasser	Einstellung pH 7.6
		in Wasser
 <u>Resolving-Gel-Puffer (4x)</u>	 <u>Stacking-Gel-Puffer (4x)</u>	 <u>Laemmli-Puffer (6x)</u>
1,5 M Tromethamin (TRIS)	250 mM Tromethamin (TRIS)	1,2 g SDS
13,87 mM Natriumlaurylsulfat	13,87 mM Natriumlaurylsulfat	2 mg Bromphenolblau
Einstellung pH 8,8 (HCL)	Einstellung pH 6,6 (HCL)	4,7 ml Glycerol
in Wasser	in Wasser	4,2 ml von 0,5 M TRIS (pH 6,8)
*filtriert, Porengröße 0,45 µm	*filtriert, Porengröße 0,45 µm	0,93 g Dithiothreitol
		4,1 ml Wasser
 <u>Blocking-Puffer</u>	 <u>Zelllysepuffer (RIPA)</u>	
5 Vol.% Milchpulver	150 mM Natriumchlorid	
in TBST	25 mM TRIS-HCL	
	Proteaseinhibitor P8340, 1:100	
	2 mM Na ₃ VO ₄	
	0.1 Vol.% SDS	
	in Wasser	

Agarose-Gelelektrophorese

<u>TAE-Puffer (50x)</u>
242,3 g/l Tromethamin (TRIS)
17,51 Vol.% Essigsäure
18,61 g/l EDTA-2Na-2H ₂ O (Titriplex III)
in Wasser

Enzyme-linked immunosorbent assay

<u>Assay-Diluent</u>	<u>Waschpuffer</u>	<u>Coating-Puffer</u>
10 Vol.% FCS	0,05 Vol.% Tween-20	0,1 M Natriumcarbonat
in PBS	in PBS	Einstellung pH 9,5 (NaOH)
		in Wasser

Luciferase-*assay*Firefly-Luciferase-Substrat

20 mM Tricine
2,67 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat
0,1 mM EDTA, pH 8,0
33,3 mM Dithiothreitol
0,53 mM ATP
270 μ M Acetyl-Coenzym A
131,6 μ g/ml Luciferin
5 mM Natriumhydroxid
0,265 mM Magnesiumcarbonathydroxid
in Wasser

2.1.2 Projektspezifische Materialien

Abschnittsüberblick	Seite
2.1.2.1 Zelllinien	21
2.1.2.2 Antikörper	22
2.1.2.3 Plasmide	22
2.1.2.4 PCR- <i>primer</i>	23
2.1.2.5 qRT-PCR: <i>Primer</i> und Sonden	24
2.1.2.6 siRNAs	25
2.1.2.7 Stimulantien	25

2.1.2.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgend angegebenen Tumorzelllinien verwendet. Die Identität der im Rahmen von Experimenten verwendeten Tumorzelllinien HEK293, 1205Lu, A549 sowie Huh7.5 wurde durch Charakterisierung ihrer *short tandem repeats* überprüft (STR-*typing*, siehe Abschnitt 3.2.3).

<u>Zelllinie</u>	<u>Ursprung</u>
HEK293	Humane, embryonale Nierenzelllinie
1205Lu	Humane Melanomzelllinie, isoliert aus Lungenmetastase
A549	Humane Adenokarzinomzelllinie (Lungenepithel)
Huh7.5	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie
BHK21	Hamsterzelllinie embryonalen Nierenursprungs
PhoenixA	Amphotrophe, HEK293-basierte Verpackungszelllinie

2.1.2.2 Antikörper

Für Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Antikörper verwendet:

<u>Erkanntes Protein</u>		<u>Ursprung</u>	<u>Hersteller</u>
TRIM9	polyklonal	Hase	Fa. ProteinTech, Chicago (USA) Artikelnummer: 107861-AP
TRIM9	monoklonal	Maus	Fa. Novus Biologicals, Littleton (USA) Artikelnummer (Klon): NBP2-03794 (2D6)
GAPDH	monoklonal	Maus	Fa. Merck Millipore, Darmstadt (D) Artikelnummer (Klon): CB1001-5000UG (6C5)
β -Aktin-HRP	monoklonal	Maus	Fa. Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA) Artikelnummer (Klon): SC-47778 (C4)
2°Maus Fc(IgG)-HRP	polyklonal	Ziege	Fa. Biorad, Hercules (USA) Artikelnummer: 1721011
2°Hase Fc(IgG)-HRP	polyklonal	Ziege	Fa. Biorad, Hercules (USA) Artikelnummer: 1706515 / 1721019

2.1.2.3 Plasmide

Für Experimente dieser Arbeit wurden die folgenden Expressionsplasmide verwendet:

<u>Gen</u>	<u>Vektorrückgrat</u>	<u>Schnittstellen</u>	<u>Resistenzgen</u>
TRIM9-GFP (n-term. <i>Tag</i>)	pcDNA3X(+)MyEGFP	EcoRI/XhoI	Amp.
TRIM9-HA (n-term. <i>Tag</i>)	pcDNA3X(+)HA	EcoRI/XhoI	Amp.
TRIM9-mCherry (c-term. <i>Tag</i>)	pcDNA TM 5/FRT/TO	FSEI/ASCI	Amp.
mCherry	pcDNA TM 5/FRT/TO	-	Amp.
MAVS-mCherry	pcDNA TM 5/FRT/TO	FSEI/ASCI	Amp.
RIG-I-CARD-Domänen	efBos	Xho1-Not1	Amp.
MDA5-CARD-Domänen	efBos	Xho1-Not1	Amp.
-	pcDNA3.1 (Leervektor)	-	Amp.
TRIM9	pMXs-Puro (retroviral)	BamHI/EcoRI	Amp. Purom.

Für Experimente dieser Arbeit wurden die folgenden 5'UTR-abhängigen Luciferase-Reporterplasmide verwendet:

<u>Promotor</u>	<u>Luciferase</u>	<u>Vektorrückgrat</u>
SV-40	<i>Renilla</i>	pRL
3 multim. PRDII-Domänen des IFN- β -Promotors (NF- κ B 3x)	<i>Firefly</i>	p55A2 / pBLCAT2
6 multim. NF- κ B-Bindungsstellen (NF- κ B 6x)	<i>Firefly</i>	pGL3
ISRE-Promotor	<i>Firefly</i>	-
IFN- β -Promotor	<i>Firefly</i>	pBL (p-125Luc nach [Yoneyama et al., 1996])

Für Experimente dieser Arbeit wurden die folgenden 3'UTR-abhängigen Reporterplasmide verwendet. Dabei kodieren beide Plasmide als Transfektionseffizienzkontrolle zusätzlich für eine sekretorische alkalische Phosphatase (seAP) unter der Kontrolle des CMV-Promotors.

<u>Promotor</u>	<u>Reporter</u>	<u>3'UTR</u>	<u>Vektorrückgrat</u>
SV-40	<i>Gaussia</i> -Luciferase	2026 Basenpaare der TRIM9-3'UTR (Allel „A/T“ an UTR-Position 1379)	pEZX-MT05
SV-40	<i>Gaussia</i> -Luciferase	2026 Basenpaare der TRIM9-3'UTR (Allel „G/C“ an UTR-Position 1379)	pEZX-MT05

2.1.2.4 PCR-*primer*

Die folgenden *primer* wurden von der Firma Metabion bezogen.

<u>Verwendungszweck</u>	<u>Primer (5'→3')</u>
Amplifikation CRISPR-Zielregion	CACAGAGCTAGCGCCTCTC (for) TACGCGATTCTTGGGGAAGC (rev)
Kl. Trim9 (FSCI/ASCI)	ATTAGGCCGGCCGATGGAGGAGATGGAAGAGGA (for) TAATGGCGCGCCGGGCTATTGATGCTCTGCTGG (rev)
Kl. Trim9 (BamHI/EcoRI)	CGCGGATCCATGGAGGAGATG (for) GACGAATTCTTAGGCTATTGATGCTCTG (rev)
Kl. Trim9-mCherry (BamHI/XhoI)	CGCGGATCCATGGAGGAGATGGAAGAG (for) CGTACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCC (rev)

2.1.2.5 qRT-PCR: *Primer* und Sonden

Die verwendeten Hybridisierungssonden mit den folgend angegebenen Nummern entstammen der „*Universal Probe Library*“ (UPL, Fa. Roche). Die verwendeten *primer* wurden von der Firma Metabion bezogen.

<u>Ziel-mRNA</u>	<u>UPL-Sonde</u>	<u><i>Primer</i> (5'→3')</u>
Inteferon- β	25	CGACACTGTTTCGTGTTGTCA (l) GAGGCACAACAGGAGAGCAA (r)
IP-10	34	GAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGT (l) GACATATACTCCATGTAGGGAAGTGA (r)
RIG-I	69	TGGACCCTACCTACATCCTGA (l) GGCCCTTGTTGTTTTTCTCA (r)
MDA5	36	AGGCACCATGGGAAGTGAT (l) GGTAAGGCCTGAGCTGGAG (r)
ISG-15	76	GCGAACTCATCTTTGCCAGT (l) TTCAGCTCTGACACCGACAT (r)
ISG-54	35	ATATAGGTCTCTTCAGCATTTATTGGT (l) GTAGGCTGCTCTCCAAGGAA (r)
Interleukin-1 β	78	CGACACTGTTTCGTGTTGTCA (l) TTGGGTAATTTTTGGGATCTACA (r)
Interleukin-6	40	GATGAGTACAAAAGTCCTGATCCA (l) CTGCAGCCACTGGTTCTGT (r)
Interleukin-8	72	GAGCACTCCATAAGGCACAAA (l) ATGGTTCCTTCCGGTGGT (r)
TNF- α	29	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA (l) CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT (r)
TRIM9 (end.) ¹	67	CCTGAACAGGAACGTGCAG (l) CACGGCACATCCTTAGGC (r)
TRIM9 (exog.) ²	55	TGGATTTTCGTGCAAGTGAAA (l) CCAGCTGTAGGATAGGGGTTG (r)
VSV N-Protein	85	CGAAGACAAACAAACCATTATTATCA (l) TCTGCAACTTCTCGGTTCAA (r)
GFP	67	GAAGCGCGATCACATGGT (l) CCATGCCGAGAGTGATCC (r)
Aktin	64	CCAACCGCGAGAAGATGA (l) CCAGAGGCGTACAGGGATAG (r)
GAPDH	60	AGCCACATCGCTCAGACAC (l) GCCCAATACGACCAAATCC (r)

¹Ein *primer* (r) ist komplementär zu einer Intron-Sequenz von TRIM9, sodass nur endogenes TRIM9 und kein artifiziell transfiziertes TRIM9 auf mRNA-Expressionsebene detektiert wird.

²Beide *primer* sind komplementär zu Exon-Sequenzen von TRIM9, sodass ebenfalls artifiziell transfiziertes TRIM9 auf mRNA-Expressionsebene detektiert wird.

2.1.2.6 siRNAs

Die folgenden siRNAs wurden von der Firma Metabion bezogen.

Name / Ziel-mRNA	Sequenz (5'→3')
Co4-RNA ¹	GCGCUAUCCAGCUUACGUA
si-TRIM9 (#58)	CUGGACAAGAUGAGCCUAU
si-TRIM9 (#95)	CUGGACAAGAUGAGCCUAUUU

2.1.2.7 Stimulantien

Im Rahmen der Experimente dieser Arbeit wurden humane Zelllinien mit folgenden Zytokinen, synthetischen Rezeptorliganden und Viren stimuliert.

Rekombinant hergestellte Zytokine:

Tumornekrosefaktor- α	Fa. R&D Systems, Minneapolis (USA)
Interferon- β	Fa. PBL Assay Science, Piscataway (USA)
Interferon- γ	Fa. R&D Systems, Minneapolis (USA)

Synthetische Rezeptorliganden:

Als synthetische RLR-Liganden wurden hochmolekulare Polyinosin-Polycytosinsäure (pI:C, Fa. Invivogen) sowie mittels *In-vitro*-Transkription synthetisierte Triphosphat-RNA (Sequenz 5'→3': GGCAUGCGACCUCUGUUUGAUCAAACAGAGGUCGCAUGCC) verwendet. Als Kontrolle der RLR-Stimulations-*assays* diente die Transfektion nicht immunstimulatorischer Co4-RNA (Sequenz 5'→3': GCGCUAUCCAGCUUACGUA). Hochmolekulares pI:C wurde in höherer Konzentration durch Zugabe in das Zellmedium weiterhin als synthetischer TLR3-Ligand verwendet.

RNA-Viren:

<u>Virus</u>	<u>Gattung</u>	<u>Polarität</u>	<u>Besonderheiten</u>
<i>Vesicular-stomatitis</i> -Virus	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	-
<i>Vesicular-stomatitis</i> -Virus M51R	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	M51R-Mutation ²
<i>Vesicular-stomatitis</i> -Virus p-GFP	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	GFP-markiertes p-Protein
Sendai-Virus	Paramyxoviridae	(-)ssRNA	-
<i>Semliki-forest</i> -Virus	Togaviridae	(+)ssRNA	-
Enzephalomyokarditis-Virus	Picornaviridae	(+)ssRNA	-
Mengo-Virus	Picornaviridae	(+)ssRNA	-
Gelbfieber-Virus	Flaviviridae	(+)ssRNA	-

¹Es handelt sich um eine ungerichtete, nicht immunstimulatorische siRNA. Sie diente als Kontrolle gegenüber der RLR-Stimulation mittels transfizierter Polyinosin-Polycytosinsäure oder Triphosphat-RNA.

²Die M51R-Mutation verhindert die durch das virale M-Protein vermittelte Suppression der Genexpression infizierter Wirtszellen, durch die unter anderem die Interferonproduktion inhibiert wird. Dadurch ermöglicht die M51R-Mutation eine gegenüber dem VSV-Wildtyp verstärkte Immunantwort.

2.2 Methodik

2.2.1 Zellulär-immunologische Methoden

Abschnittsüberblick	Seite
2.2.1.1 Zellkultur	26
2.2.1.2 Transfektion und Stimulation von Zellen	27
2.2.1.3 Stabile Überexpression durch retrovirale Transduktion	28
2.2.1.4 CRISPR/Cas9: Etablierung stabiler <i>Knock-out</i> -Zelllinien	29
2.2.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und <i>western-blot</i>	30
2.2.1.6 ELISA: Quantifizierung von IP-10, IL-6, TNF- α	31
2.2.1.7 Dualer Luciferase- <i>assay</i>	32
2.2.1.8 Virustiterbestimmung mittels TCID ₅₀ -Endpunktverdünnungs- <i>assay</i> . .	35
2.2.1.9 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie	36
2.2.1.10 Durchflusszytometrie	37

2.2.1.1 Zellkultur

Die verschiedenen Zelllinien wurden in DMEM-Vollmedium (BHK21-Zellen in BHK-Medium, siehe 2.1.1.4) im CO₂-Begasungsbrutschrank (37 °C / 95 % Luftfeuchtigkeit / 0.05 % CO₂) kultiviert. Bei Erreichen von 80-100 % Konfluenz erfolgte ein Mediumwechsel. Überschüssige Zellen wurden nach Abtrypsinieren verworfen. Das Einfrieren von Zellen erfolgte in fetalem Kälberserum (FCS) inklusive 10 Vol.-% DMSO vorübergehend bei -80 °C oder dauerhaft in Flüssigstickstoff.

Im Rahmen von Experimenten wurde die Lebendzellzahl nach Zugabe von Trypanblau mittels einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ermittelt und die entsprechende Anzahl von Zellen in 6- bis 96-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert.

Die Arbeit mit Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer *Laminar-air-flow*-Werkbank.

2.2.1.2 Transfektion und Stimulation von Zellen

Die Transfektion und Stimulation von Zellen erfolgte in 6- bis 96-*well*-Flachbodenplatten. Dabei wurden die Zellen zuvor in 200 µl Medium (96-*well*-Flachbodenplatte), 1 ml Medium (24-*well*-Flachbodenplatte) beziehungsweise 2 ml Medium (6-*well*-Flachbodenplatte) kultiviert. Die Zugabe von Transfektionslösungen erfolgte auf das vorbestehende Medium, von dem zuvor das zuzuführende Volumen zwecks Beibehaltung der oben genannten Gesamtvolumina abgenommen wurde.

Transfektion von DNA (Plasmide):

In Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie wurden für die Transfektion verschiedene Transfektionsmittel entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Das Transfektionsreagenz „Lipofectamine 2000“ (3 µl/µg DNA) wurde für HEK293-Zellen, A549-Zellen und Huh7.5-Zellen verwendet. Das Transfektionsmittel „TransIT-X2“ (3 µl/µg DNA) wurde zur Transfektion der Zelllinien HEK293, 1205Lu und A549 verwendet. Die Inkubation der zu transfizierenden Plasmid-DNA und des Transfektionsmittels erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll in OptiMem (siehe Abschnitt 2.1.1.3).

Transfektion von RNA:

Im Rahmen von Stimulations-*assays* erfolgte die Transfektion immunstimulatorischer RNA mittels des Transfektionsreagenz „RNAiMax“ für alle Zelllinien. Dabei wurde die zu transfizierende RNA sowie in einem Parallelansatz das sich an der RNA-Menge orientierende Transfektionsreagenzvolumen in gleichen Volumina OptiMem für 10 Minuten inkubiert. Es folgte das Vermischen der Parallelansätze und die Inkubation für weitere 20 Minuten, bevor die Transfektionslösung zu dem vorbestehendem Zellmedium nach Abnahme des zuzuführenden Volumens zugegeben wurde.

Die Stimulationskonzentrationen von pI:C betrugen für 1205Lu-Zellen 10-20 ng/ml (+1 µl „RNAiMAX“ / 10-20ng pI:C) sowie für HEK293- und A549-Zellen 100-200 ng/ml (+1 µl „RNAiMAX“ / 100-200 ng pI:C).

Die Stimulationskonzentrationen der Triphosphat-RNA (3pRNA) betrugen 1000 ng/ml (+3 µl „RNAiMAX“ / 1000 ng 3pRNA) für 1205Lu-Zellen und 3000 ng/ml (+3 µl „RNAiMAX“ / 3000 ng 3pRNA) für HEK293-Zellen.

Stimulation mit Zytokinen und Infektion mit Viren:

Für die Stimulation mit rekombinant synthetisierten Zytokinen wurden diese in gewünschter Stimulationskonzentration Frischmedium zugesetzt. Es folgte der Austausch des Zellkulturmediums durch gleiches Volumen des mit Zytokinen versetzten Frischmediums.

Die Virusmenge im Rahmen von Infektionen mit plaquebildenden Viren orientierte sich an der zu infizierenden Zellzahl. Die *multiplicity of infection* (MoI) beschreibt hierbei das Verhältnis von *plaque forming units* (PFUs) zur Zellzahl und entsprach im Rahmen der Infektions-*assays* dieser Arbeit Werten zwischen 0,1 und 50. Die Virusmenge im Rahmen von Infektionen mit nicht plaquebildenden Viren (Sendai-Virus) orientierte sich als Konzentration am Mediumsvolumen. Sendai-Virus-Infektionen erfolgten mit einer Konzentration von 20-40 PFUs/ml. Für die Infektion mit

Viren wurde Frischmedium mit der entsprechenden Virusmenge versetzt. Es folgte der Austausch des Zellkulturmediums durch gleiches Volumen des mit Viren versetzten Frischmediums.

2.2.1.3 Stabile Überexpression durch retrovirale Transduktion

Methodisches Prinzip

Grundprinzip der retroviralen Transduktion ist die Infektion von Zielzellen mit genetisch modifizierten, retroviralen Partikeln, die in Analogie zu Retroviren ihr eigenes Genom stabil in das Wirtsgenom integrieren können, im Gegensatz zu natürlich vorkommenden Retroviren jedoch nicht replikationskompetent sind.

Für die Produktion der retroviralen Partikel werden die Verpackungszellen mit einer retroviralen Vektorplasmid-DNA transfiziert, die unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors neben dem zu integrierenden Gen für ein resistenzvermittelndes Protein kodiert, das zu einem späteren Zeitpunkt eine eukaryotische Selektion erlaubt. Die für den Zusammenbau und die Replikation von Retroviren notwendigen Gene (*gag*, *pol*, *env* - kodierend für Matrix- und Kapsidproteine, reverse Transkriptase, Integrase und Protease) sind dabei nicht auf dem retroviralen Vektorplasmid kodiert, sondern stabil in das Genom der Verpackungszelllinie integriert. Vermittelt durch ein Verpackungssignal auf dem Vektor kann dieser dadurch innerhalb der Verpackungszellen zu einem funktionsfähigen, infektiösen, retroviralen Partikel (ausgestattet mit den Genprodukten der *gag*-/*pol*-/*env*-Gene) zusammengebaut und in den Überstand abgegeben werden, ist jedoch replikationsdefizient, da er selbst nicht für die eigenen Struktur- und Funktionsproteine kodiert.

Protokoll

Im Rahmen dieser Arbeit wurden amphotrophe PhoenixA-Verpackungszellen im 6-*well*-Format (300.000 Zellen pro *well*) ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion des retroviralen Vektors „pMXs-Puro“ (1,5 µg pro *well*, Transfektionsreagenz „Lipofectamine-2000“), in den zuvor die kodierende Region des TRIM9-Gens (TRIM9l) inseriert wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurde der Überstand verworfen und frisches Medium (1 ml pro *well*) zugegeben, welches nach 48 Stunden Inkubationszeit auf der Verpackungszelllinie entnommen, steril filtriert und bei -80 °C eingefroren wurde.

Zu einem späteren Zeitpunkt wurden zuvor ausplattierte Zielzellen im 6-*well*-Format in 1 ml des viruspartikelenthaltenden Mediums für 90 Minuten inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2 ml Frischmedium und eine Inkubation über 48 Stunden. Anschließend wurden die Zielzellen für zwei Wochen in Puromycin-haltigem Medium kultiviert. Die zelllinienspezifischen Puromycinkonzentrationen (HEK293: 1 µg/ml, 1205Lu: 1 µg/ml, A549: 2,5 µg/ml, Huh7.5: 5 µg/ml) wurden zuvor austriert, um einen zelllinienspezifisch optimalen Selektionsdruck zu erreichen.

Im Anschluss erfolgte mittels Grenzverdünnung das Ausplattieren einzelner Zellen pro *well* im 96-*well*-Format. Die heranwachsenden Zellklone wurden mittels *immunoblotting* (siehe Abschnitt 2.2.1.5) und qRT-PCR (siehe Abschnitt 2.2.2.4) auf eine Überexpression von TRIM9 getestet.

2.2.1.4 CRISPR/Cas9: Etablierung stabiler *Knock-out*-Zelllinien

Methodisches Prinzip

Mit der Entdeckung repetitiver Sequenzen im Genom von *E. Coli* im Jahr 1987 wurde der Grundstein für die Entwicklung des CRISPR/Cas9-Systems gelegt, das im Jahr 2013 erstmals erfolgreich zum zielgerichteten Editieren eukaryotischer Gene verwendet wurde [Cong et al., 2013; Ishino et al., 1987; Mali et al., 2013]. Diese repetitiven Sequenzen, inzwischen in ihrer Gesamtheit als CRISPR-*array* bezeichnet, sind ubiquitär in Prokaryonten vertreten und flankieren Gene von Cas-Endonukleasen [Jansen et al., 2002; Mojica et al., 2000]. Im Jahr 2005 konnte gezeigt werden, dass die zwischen den CRISPR-*repeats* gelegenen DNA-Fragmente (*spacer*) nicht bakteriellen Ursprungs sind [Mojica et al., 2005; Pourcel et al., 2005]. Zwei Jahre später wurde experimentell demonstriert, dass Bakterien, die DNA-Fragmente von Phagen als *spacer* zwischen ihre CRISPR-*repeats* im CRISPR-*array* integrieren, eine Resistenz gegenüber einer Neuinfektion erlangen [Barrangou et al., 2007].

Damit konnte gezeigt werden, dass das CRISPR/Cas-System eine Art bakterielles, adaptives Immunsystem darstellt. So sind von Phagen infizierte Bakterien in der Lage, DNA-Fragmente der Phagen als *spacer* in ihr CRISPR-*array* zu integrieren. Die Transkription des CRISPR-*arrays* sowie die anschließende RNA-Prozessierung dient der Synthese von *Single-guide*-RNAs (sgRNA) bzw. CRISPR-RNAs (crRNA), die komplementär zu der zuvor ins bakterielle Genom integrierten Phagen-DNA sind und so mit dieser hybridisieren können. Weiterhin rekrutieren sgRNAs sogenannte Cas-Endonukleasen, die Phagen-DNA dadurch zielgerichtet abbauen können, siehe Abb. 2.2.1 [Hsu et al., 2014].

Um dieses System zum Editieren eukaryotischer Gene zu verwenden, kommen für sequenzspezifische sgRNAs sowie für entsprechende Cas-Endonukleasen kodierende Plasmide zum Einsatz. Durch die Wahl einer sgRNA-Sequenz, die komplementär zur Zielregion innerhalb des zu editierenden Gens ist, kann die an die sgRNA gebundene und ebenfalls vom CRISPR-Plasmid kodierte Cas9-Endonuklease innerhalb des Zielgens Doppelstrangbrüche einfügen. Durch Fehlreparatur bedingte Insertionen oder Deletionen einzelner Basenpaare begünstigen durch eine Verschiebung des Leserasters die Entstehung vorzeitiger *Stop-codons* innerhalb des Zielgens, was dessen funktionellen *knock-out* bedingt.

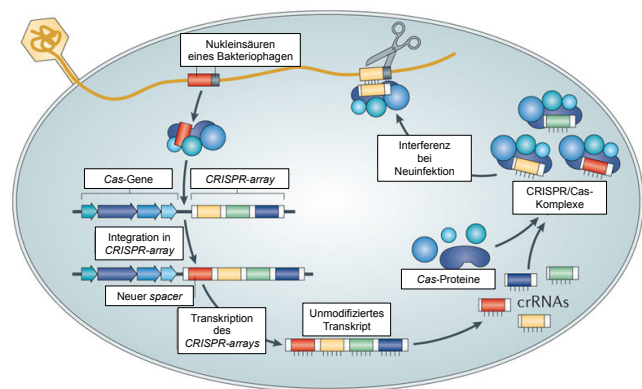


Abbildung 2.2.1: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas-Systems als bakterielles, adaptives Immunsystem. Modifiziert aus [Samson et al., 2013].

Protokoll

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das CRISPR/Cas9-System verwendet, um TRIM9-defiziente Zellmodelle auf Basis der Zelllinien HEK293, A549, 1205Lu und Huh7.5 zu etablieren. Das Fragment von Basenposition 227-249 (Sequenz 5'→3': GCGGCTATGGCTCCTACGGGGG) innerhalb des TRIM9-Gens diente als Zielregion der entsprechend komplementär gewählten sgRNA. Das verwendete Plasmid kodierte neben der sgRNA und der Cas9-Endonuklease zusätzlich für rotfluoreszierendes Protein (RFP), das eine durchflusszytometrische Selektion transfizierter Zellen ermöglichte.

Nach Ausplattieren der entsprechenden Wildtypzelllinien im 6-*well*-Format und der Transfektion des CRISPR/Cas9-Plasmids wurden am Folgetag durchflusszytometrisch RFP-positive Zellen sortiert, mittels Grenzverdünnung vereinzelt und im 96-*well*-Format ausplattiert. Die aus Einzelzellklonen heranwachsenden Zelllinien wurden mittels T7-Endonuklease-*screening* (siehe Abschnitt 2.2.2.3), *immunoblotting* (siehe Abschnitt 2.2.1.5) sowie mittels Sequenzierung der CRISPR-Zielregion auf einen möglichen *knock-out* von TRIM9 geprüft. Zudem zeigte sich durch die Degradation von RNA-Transkripten mutierter Gene eine Reduktion des mRNA-Expressionsniveaus von TRIM9 für alle etablierten *Knock-out*-Zellen. Dies konnte mittels qRT-PCR (siehe Abschnitt 2.2.2.4) nachgewiesen werden.

Die Effizienz des Verfahrens betrug zelllinienübergreifend deutlich weniger als 5 Prozent.

2.2.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und *western-blot*

Methodisches Prinzip

Der Nachweis beziehungsweise die Mengenquantifizierung intrazellulärer Proteine mittels *immunoblotting* basiert auf der elektrophoretischen Größenauftrennung geladener Proteine in Polyacrylamidgelen und dem anschließenden immunologischen Nachweis der vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragenen Proteine.

Dabei bewirkt die Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) die negative Ladung aller Proteinseitenketten und gewährleistet damit die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe, unbeeinflusst von verschiedenen Proteineigenladungen. Zusätzlich werden die Proben im Vorfeld auf 95 °C erhitzt, um Störeinflüsse verschiedener Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine zu verhindern.

Nach einem Elektrotransfer der Proteine auf die PVDF-Membran, an der die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften, erfolgt deren antikörperbasierter Nachweis. Dabei bindet der Primärantikörper das nachzuweisende Protein, während der Sekundärantikörper die konstante Domäne des Primärantikörpers bindet und an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist. Der Substratumsatz von HRP (z.B. Luminol) ermöglicht somit letztlich den örtlichen Nachweis von Proteinen auf Chemolumineszenzbasis.

Zusätzlich zum eigentlichen Protein wird stets das Genprodukt eines *Housekeeping*-Gens (z.B. GAPDH, β -Aktin) detektiert, das von Zellen konstant exprimiert wird und damit als Ladungskontrolle dient.

Protokoll

Nach der Zelllyse in RIPA-Puffer erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels eines *Bradfordassays* („DCTM protein assay“, Fa. Biorad, Verwendung gemäß den Herstellerangaben). Nach Angleichen der Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit Laemmli-Puffer sowie β -Mercaptoethanol (5 Vol.-%) versetzt und für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt. Die Proteinauftrennung erfolgte im zehnprozentigen Polyacrylamidgel bei Spannungen von 100-150 V. Der Proteintransfer auf die zuvor mittels Methanol aktivierte PVDF-Membran in *Wet*-Puffer wurde durch eine konstante Spannungsanlage von 110 V über zwei Stunden gewährleistet. Nach Abblocken freier Bindungsstellen der Membran (Inkubation in TBST-Puffer inklusive 5 Vol.-% Milchpulver für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C) und drei zehnmütigen Waschschritten in TBST-Puffer erfolgte die Inkubation der Membran für 12-24 Stunden bei 4 °C im Primärantikörper: TRIM9-Antikörper 1:500 verdünnt in TBST-Puffer inklusive 5 % BSA, GAPDH-Antikörper 1:3000 verdünnt in TBST-Puffer inklusive 5 % BSA, β -Aktin-Antikörper 1:10000 verdünnt in TBST-Puffer inklusive 5 % BSA. Nach erneutem Waschen wurde die Membran bei Raumtemperatur für eine Stunde im Sekundärantikörper inkubiert (Anti-Maus-IgG: 1:10.000 verdünnt in TBST-Puffer inklusive 5 % BSA, Anti-Hasen-IgG: 1:2.500 verdünnt in TBST-Puffer inklusive 5 % BSA), bevor nach nochmaligen Waschschritten die Detektion nach Substratzugabe mittels Chemolumineszenz erfolgte.

2.2.1.6 ELISA: Quantifizierung von IP-10, IL-6, TNF- α

Methodisches Prinzip

Konzentrationen von sekretorischen Proteinen im Zellmedium (im Rahmen dieser Arbeit IP-10, Interleukin-6 und TNF- α) wurden mittels *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) bestimmt, deren Grundprinzip der antikörperbasierte Nachweis spezifischer Proteine ist.

Dabei wird das nachzuweisende Protein spezifisch vom *Coating*-Antikörper gebunden, der durch Inkubation über Nacht am Boden von Polystyren-96-*well*-Platten haftet. Ein anderes Epitop des nachzuweisenden Proteins wird im Anschluss durch den Detektionsantikörper erkannt, der entweder direkt oder über Streptavidin-Biotin-Bindungen an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden ist. Nach Substratzugabe erfolgt ein HRP-vermittelter Farbumschlag, dessen Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt und dessen Intensität im Anschluss photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm ausgelesen werden kann. Die Umrechnung in Proteinkonzentrationen erfolgt durch den Abgleich mit einer Standardreihe bekannter Proteinkonzentrationen.

Protokoll

Als Standard wurde rekombinantes Protein in *assay-diluent* (siehe Abschnitt 2.1.1.4) verdünnt und die zu messenden Zellüberstände wurden soweit verdünnt, dass deren Konzentrationen des nachzuweisenden Proteins innerhalb der Standardkonzentrationen lagen. Die weitere Durchführung entsprach den Herstellerangaben der verwendeten ELISA-*kits* (siehe Abschnitt 2.1.1.2), wobei dabei pro *well* nur 50 % der angegebenen Volumina antikörperhaltiger Reagenzien verwendet wurden.

Diese reduzierten Reagenzienmengen haben sich im Vergleich mit den vom Hersteller empfohlenen Volumina als ausreichend herausgestellt.

2.2.1.7 Dualer Luciferase-*assay*

Quantifizierung von Promotoraktivitäten

Methodisches Prinzip

Mittels dualer Luciferase-*assays* wurden im Rahmen dieser Arbeit Aussagen über zeitlich kumulative, transkriptionsfaktorvermittelte Promotoraktivitäten getroffen, während mittels qRT-PCR-*assays* dies nur indirekt über die Transkriptquantifizierung jeweiliger Gene zu spezifischen Zeitpunkten möglich ist. Das Grundprinzip dualer Luciferase-*assays* ist hierbei die Transfektion von Reporterplasmiden, kodierend für zwei Reporter (z.B. Luciferasen) unter der Kontrolle konstitutiv aktiver oder mittels Transkriptionsfaktoren aktivierbarer Promotoren. Dabei wird die Expression eines Kontrollreporters (z.B. *Renilla*-Luciferase) durch einen konstitutiv aktiven Promotor kontrolliert und dient innerhalb des *assays* als Transfektionseffizienzkontrolle. Das kotransfizierte Reporterplasmid kodiert beispielsweise für die *Firefly*-Luciferase unter der Kontrolle eines transkriptionsfaktorsensitiven Promotorkonstruktes, sodass die *Firefly*-Luciferase verstärkt nach stimulationsbedingter Transkriptionsfaktoraktivierung synthetisiert wird.

Die Quantifizierung der zeitlich kumulativen Promotoraktivität erfolgt durch Zellyse mehrere Stunden nach stattgehabter Transfektion der Reporterplasmide und gegebenenfalls darauf gefolgter Stimulation. Nach Zugabe von reporterspezifischen Substraten (z.B. Coelenterazin als *Renilla*-Luciferase-Substrat, Luciferin als *Firefly*-Luciferase-Substrat, siehe Abschnitte 2.1.1.3 und 2.1.1.4) in zwei getrennten Ansätzen zum Zellysat erfolgt deren Umsatz unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff sowie der Emission von Lichtsignalen. Die Detektion deren Intensität erlaubt Rückschlüsse auf die zuvor synthetisierte und dem Lichtsignal proportionale Menge der Reporter, die wiederum von der Aktivität ihrer Promotorkonstrukte abhängig ist.

Bei Verwendung der *Renilla*-Luciferase als Kontrollreporter sowie der *Firefly*-Luciferase als Reporter transkriptionsfaktorabhängiger Promotoraktivitäten erfolgte die Normalisierung des *Firefly*-Luciferase-Lichtsignals auf die Intensität des *Renilla*-Luciferase-Lichtsignals. Diese Darstellung bereinigt den *assay* von Störeinflüssen verschiedener Transfektionseffizienzen und wird durch die Darstellung in *relative light units* (RLU) repräsentiert.

Charakteristika der verwendeten Reporterplasmide

Um die transkriptionelle Hochregulation von IFN- β , von Typ-I-Interferon-sensitiven Genen (ISGs) sowie die NF- κ B-vermittelte Regulation verschiedener Gene zu quantifizieren wurden *Firefly*-Luciferase-Reporterplasmide mit entsprechenden Promotorenkonstrukten eingesetzt.

Während die Promotorregion des IFN- β -Reporterplasmids aus den verschiedenen transkriptionsfaktorbindenden Domänen PRDI - PRDIV bestand (siehe Abb. 2.2.2), wurden isolierte, multimerisierte PRDII-Domänen als Reporter der NF- κ B-Aktivität verwendet. Dabei unterschieden sich die

zwei verwendeten NF- κ B-Reporterkonstrukte hinsichtlich der Anzahl der multimerisierten PRDII-Domänen. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass die höhere Anzahl der NF- κ B-Bindungsstellen (6x statt 3x) zu einer höheren Promotoraktivität und Luciferaseexpression bereits im unstimulierten Zustand führte, während nach der Zugabe von TNF- α als NF- κ B-aktivierendes Stimulans kein Aktivitätsunterschied der *Firefly*-Luciferase in Abhängigkeit der Anzahl multimerisierter PRDII-Domänen detektierbar war (siehe Abb. 2.2.3). Die höhere Basalaktivität des „6x-NF- κ B-Reporters“ lässt damit zwar möglicherweise eine validere Analyse verschiedener NF- κ B-Basalaktivitäten zu, wirkt sich jedoch negativ auf die als *fold induction* messbare Stimulationseffizienz aus (siehe Abb. 2.2.3).

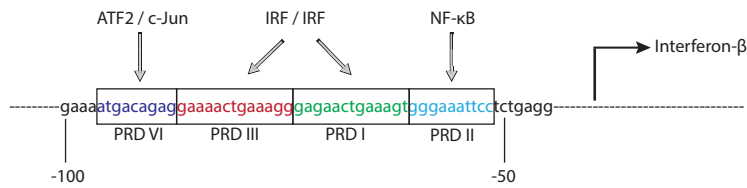


Abbildung 2.2.2: Schematische Darstellung des IFN- β -Promotors mit Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren. Abbildung gestaltet in Anlehnung an [Honda et al., 2005].

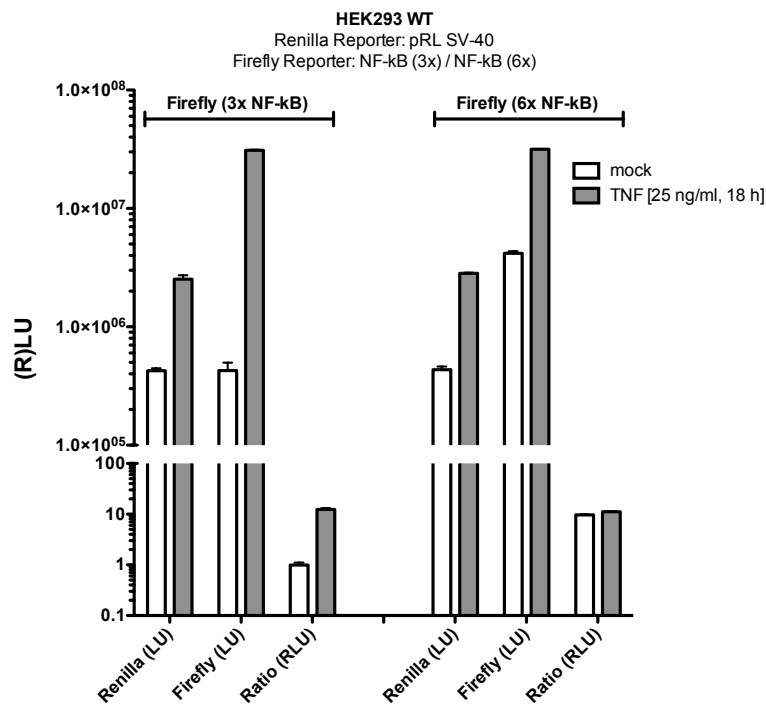


Abbildung 2.2.3: Das Reporterplasmid „6x NF- κ B“ zeigt eine hohe Basalexpression der *Firefly*-Luciferase, wodurch der Effekt der TNF- α -Stimulation geschmälert wird. Nach dem Ausplattieren von 25.000 HEK293-WT-Zellen pro well in 96-well-Flachbodenplatten erfolgte am nächsten Tag die Kotretransfektion von 40 ng des angegebenen *Renilla*-Kontrollplasmids gemeinsam mit 40 ng von einem der zwei verschiedenen NF- κ B-Reporterplasmiden. Die beiden NF- κ B-Reporterplasmide unterscheiden sich dabei in der Anzahl der NF- κ B-Bindungsstellen (6x, 3x) in den die *Firefly*-Luciferase kontrollierenden Promotorkonstrukten. Sechs Stunden nach der Transfektion der Reporterplasmide erfolgte der Austausch des Mediums mit Zugabe von TNF- α in den dargestellten Stimulationskonditionen. Nach weiteren 18 Stunden erfolgte die Zellyse und die Menge der exprimierten *Firefly*-Luciferase wurde auf Chemolumineszenzbasis ausgelesen. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde die Menge der exprimierten *Renilla*-Luciferase bestimmt. Die Daten stellen die Aktivitäten beider Luciferasen einzeln (LUs) sowie das Verhältnis der Aktivitäten beider Luciferasen (RLUs) als Mittelwerte \pm SEM (hier als methodischer Fehler) auf Basis des in Triplikaten durchgeführten Experimentes dar; $n=1$.

Das verwendete ISRE-Reporterplasmid verfügte über einen die *Firefly*-Luciferase kontrollierenden Promotor, dessen Aktivität ähnlich wie Promotorregionen endogener ISGs durch die Transkriptionsfaktoren pSTAT1/pSTAT2 und ISGF3 reguliert wird.

Protokoll

Luciferase-*assays* wurden im 96-*well*-Format mit jeder Bedingung in Triplikaten durchgeführt. Nach Ausplattieren der Zellen (20.000 A549-Zellen pro *well*, 25.000 HEK293-Zellen pro *well*, 30.000 1205Lu-Zellen pro *well*) erfolgte am nächsten Tag die Transfektion der Reporterplasmide unter Verwendung des Transfektionsmittels „TransIT-X2“ gemäß den Herstellerangaben. Dabei wurden pro *well* bei einer Gesamtmenge von 140 ng Plasmid-DNA jeweils 40 ng des Reporter- und Kontrollplasmids verwendet, während die verbleibenden 60 ng durch einen Leervektor oder zwecks Stimulations- oder Überexpressionskonditionen mit Alternativplasmiden aufgefüllt wurden.

Die Stimulation mittels einer Überexpression intrazellulärer Signalproteine (RIG-I-CARD-Domänen, MDA5-CARD-Domänen) erfolgte durch direkte Kotransfektion der jeweiligen Expressionsplasmide mit den Reporterplasmiden. Anderweitige Stimulationen erfolgten fünf bis acht Stunden nach der Transfektion der Reporterplasmide durch erneute Transfektion synthetischer RLR-Liganden (pI:C, 3pRNA) oder Zugabe von Zytokinen (IFN- β , TNF- α), anderer Stimulantien (PMA) oder Viren zum vorbestehendem Medium.

Nach weiteren 12-24 Stunden folgte das Entfernen des Mediums sowie die Zellyse durch Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur in „*Passive Lysis Buffer*“ (50 μ l pro *well*, siehe Abschnitt 2.1.1.3). Die Zugabe von 20 μ l der luciferasespezifischen Substrate (Luciferin als *Firefly*-Luciferase-Substrat bzw. Coelenterazin 1:800 in Wasser *Renilla*-Luciferase-Substrat, siehe Abschnitte 2.1.1.3 und 2.1.1.4) zu jeweils dem gleichen Volumen des Zelllysats in zwei separaten Ansätzen startete die Lumineszenzreaktion. Die Intensität der Lichtemission wurde unmittelbar im Anschluss durch den „Mithras LB940 *Microplate Reader*“ detektiert (siehe Abschnitt 2.1.1.1).

Identifizierung von *microRNA*-targets

Methodisches Prinzip und verwendete Reporterplasmide

Das Grundprinzip von Luciferase-*assays* wurde im Rahmen dieser Arbeit weiterhin verwendet, um den Einfluss von Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) 3'-untranslatierter Regionen (3'UTR) auf die Expression 5'-gelegener Gene zu quantifizieren. Die 3'UTR trägt über Interaktionen mit *micro*RNAs und stabilisierenden beziehungsweise destabilisierenden Proteinen maßgeblich zur posttranskriptionellen Regulation der Genexpression bei.

Diesbezüglich wurde ein Reporterplasmid verwendet, das sowohl für den Reporter selbst (hier: sekretorische *Gaussia*-Luciferase, GLuc) als auch für einen Kontrollreporter als Transfektionseffizienzkontrolle (hier: sekretorische alkalische Phosphatase, seAP) kodierte. Beide Reporter wurden dabei durch konstitutiv aktive Promotoren kontrolliert. Als mögliche *micro*RNA-Zielstruktur kodierte das Plasmid 3'-gelegen der *Gaussia*-Luciferase weiterhin für die ersten 2026 Basenpaare der 3'UTR des TRIM9-Gens (in Abb. 2.2.4 als „miR *Target*“ bezeichnet). So wurden im Rahmen dieser

Arbeit zwei nahezu identische Reporterplasmide vergleichend verwendet, die sich nur hinsichtlich des SNPs rs12879906 an Basenposition 1379 der TRIM9-3'UTR unterschieden.

Auf diese Weise konnte durch den Vergleich der relativen GLuc-Expression (relativ zur seAP-Expression) in Abhängigkeit von dem Einzelnukleotidpolymorphismus eine Aussage darüber getroffen werden, ob die Allele des SNPs der TRIM9-3'UTR möglicherweise die Expression von TRIM9 differentiell beeinflussen.

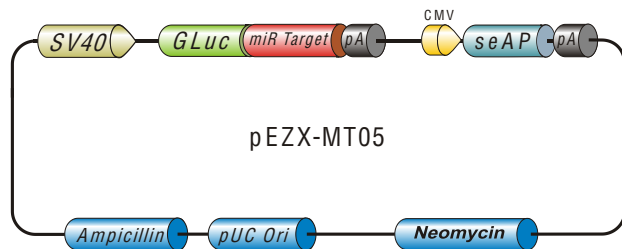


Abbildung 2.2.4: Schematische Darstellung der die TRIM9-3'UTR enthaltenden Reporterplasmide. Angegeben entsprechend der Herstellerdokumentation aus <http://www.genecopoeia.com/product/mirna-targets/>.

Protokoll

Nach Ausplattieren von Zellen im 96-well-Format in 200 µl Kulturmedium (1205Lu: 30.000 Zellen pro well, HEK293: 25.000 Zellen pro well) erfolgte am nächsten Tag die Transfektion der Reporterplasmide sowie mit einem Zeitverzug von fünf bis acht Stunden gegebenenfalls eine Stimulation unter Austausch des Zellkulturmediums.

Nach weiteren 24 bis 48 Stunden folgte die Abnahme des Mediums. Die Zugabe von 20 µl der jeweiligen Enzymsubstrate (GLuc-Substrat: Coelenterazin 1:250 in Wasser, seAP-Substrat siehe Abschnitt 2.1.1.2) zu 50 µl des abgenommenen Zellkulturmediums in zwei separaten Ansätzen startete die Lumineszenzreaktion. Die Intensität der Lichtemission wurde unmittelbar im Anschluss durch den „Mithras LB940 Microplate Reader“ (siehe Abschnitt 2.1.1.1) detektiert.

Jede Bedingung des *assays* wurde in Triplikaten durchgeführt. Die Auswertung erfolgte als Darstellung der relativen Lichtemissionen der Reporter als RLUs (Verhältnis GLuc/seAP).

2.2.1.8 Virustiterbestimmung mittels TCID50-Endpunktverdünnungs-assay

Methodisches Prinzip

Virustiterbestimmungen in Zellüberständen erfolgten im Rahmen dieser Arbeit mittels TCID50-Endpunktverdünnungs-assays (*tissue culture infective dose 50 %*). Dabei werden virussensitive BHK21-Zellen in verschiedenen Verdünnungen virushaltigen Mediums inkubiert. Nach zwei bis fünf Tagen wird aus der höchsten, noch zytopathische Effekte hervorrufenden Verdünnung der TCID50-Messwert mittels des *Spearman*-und-*Kärber*-Algorithmus als Korrelat der ursprünglichen Viruskonzentration berechnet, wie dies durch Hierholzer und Killington beschrieben wird [Hierholzer and Killington, 1996]. Dafür wurde ein seitens der Universität Heidelberg bereitgestelltes Excel-sheet verwendet (abrufbar unter: <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Downloads.126386.0.html>).

Protokoll

Nach Ausplattieren von BHK21-Zellen (10.000 Zellen pro *well*) im 96-*well*-Format erfolgte am nächsten Tag der Austausch des Mediums durch verschiedene Verdünnungen virushaltigen Überstands. Dafür wurde von jeder zu testenden Probe eine zwölfstufige Verdünnungsreihe angefertigt, wobei jede Verdünnungsstufe in acht Replikaten unter Verwendung von BHK21-Kulturmedium als Verdünnungsreagenz getestet wurde.

Nach zwei bis fünf Tagen wurde lichtmikroskopisch die höchste Verdünnung ermittelt, die noch zytopathische Effekte hervorrief. Dies ermöglichte die Berechnung des TCID₅₀-Messwerts als Korrelat der ursprünglichen Viruskonzentration im unverdünnten Testüberstand.

2.2.1.9 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Methodisches Prinzip

Zur Darstellung intrazellulärer Proteinverteilungen und Viruslokalisationen wurden in dieser Arbeit fluoreszenzmarkierte Fusionsproteine (Markierung durch Fusion mit GFP oder mCherry) mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Dabei rastert ein Laserstrahl definierter Wellenlänge eine zweidimensionale Ebene des Probenmaterials ab und regt dadurch zuvor ins Probenmaterial eingebrachte Fluorochrome zur Fluoreszenzemission an. Diese kann detektiert und durch die räumlich diskrete Probenraasterung örtlich zugeordnet werden, wodurch im Nachhinein ein Bild der abgerasterten Ebene rekonstruiert werden kann. Durch die wellenlängenspezifische Anregung verschiedener Fluorochrome mit unterschiedlichen Emissionsspektren können verschiedene Fluorochrome im selben Probenmaterial unterschieden werden.

Protokoll

Nach dem Ausplattieren der Zellen auf sterilen Deckgläsern im 24-*well*-Format (circa 50.000 Zellen pro *well*) erfolgte am nächsten Tag die Transfektion mit für entsprechende Fusionsproteine kodierenden Expressionsplasmiden. Zur Darstellung der intrazellulären Viruslokalisation erfolgte alternativ die Infektion der Zellen mit Virusstämmen, die für fluoreszenzmarkierte Strukturproteine der Viren kodieren (hier: VSV-p-GFP, siehe Abschnitt 2.1.2.7). Nach 12-24 Stunden erfolgte das Abwaschen des Mediums mittels phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und die Fixation der auf dem Deckglas adhärenen Zellen durch Inkubation (10 Minuten, Raumtemperatur) in vierprozentiger Paraformaldehydlösung (auf PBS-Basis). Die Zellkerne wurden mittels „Hoechst33342“ (Verdünnung 1:10.000 in PBS, Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur) angefärbt. Es folgten drei zehnminütige Waschgänge in PBS, bevor das zellbehaftete Deckglas mittels Eindeckmedium („VECTASHIELD“, siehe Abschnitt 2.1.1.3) auf einem Objektträger fixiert wurde.

Die Visualisierung erfolgte mit dem Konfokalmikroskop „Leica TCS SP5“ (siehe Abschnitt 2.1.1.1).

2.2.1.10 Durchflusszytometrie

Methodisches Prinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Unterscheidung und Quantifizierung von Zellpopulationen nach ihrer Zellgröße, Zellgranularität oder nach Fluoreszenzeigenschaften in Folge der Einbringung von Fluorochromen in das Probenmaterial. Dabei passieren einzelne Zellen in einer Laminarströmung verschieden konfigurierbare Laserstrahlen, woraufhin Zellen entsprechend ihrer Reflektions- und Streuungscharakteristika sowie gegebenenfalls entsprechend ihres fluorochrombasierten Emissionsverhaltens nach Anregung durch monochromatisches Laserlicht quantitativ in verschiedene Zellpopulationen eingeteilt werden können.

Protokoll

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer „FACS Calibur“ (siehe Abschnitt 2.1.1.1) verwendet. Dabei wurden Zellklone entsprechend ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) charakterisiert sowie Zellsubpopulationen gemäß ihrer fluorochromen Eigenschaften entsprechend der Expression von plasmidkodierten Fusionsproteinen (GFP- oder mCherry-Markierung) und der Replikation von fluoreszenzmarkierten Viren (GFP-Markierung) unterteilt.

Zwecks der Charakterisierung von Granularität und Zellgröße verschiedener Zellklone wurden diese nach Abtrypsinierung und Resuspension in DMEM-Kulturmedium direkt für die durchflusszytometrische Analyse verwendet.

Die Analyse des prozentualen Anteils virusinfizierter Zellen nach definierter Inkubationszeit diente als Maß für die virale Replikationsgeschwindigkeit. Hierfür wurden virusinfizierte Zellen durch Abtrypsinierung, Resuspension in DMEM-Kulturmedium, Abwaschen des Mediums durch PBS und Resuspension in vierprozentiger Paraformaldehydlösung (auf PBS-Basis) vorbereitet und fixiert. Nach 30-minütiger Inkubationszeit in Paraformaldehydlösung (PFA) wurden die in Suspension befindlichen Viren mittels hochenergetischem UV-Licht (25 mJ/cm^2 , 15 Sekunden) inaktiviert, bevor die Zellsuspension zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet wurde.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Abschnittsüberblick	Seite
2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese . . .	38
2.2.2.2 Klonierung	39
2.2.2.3 Mutations- <i>screening</i> : T7-Endonuklease-Verdau und Sequenzierung . . .	39
2.2.2.4 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	41

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

Ziel der Polymerase-Kettenreaktion ist die Amplifikation eines doppelsträngigen DNA-Fragments, das durch zwei das DNA-*template* flankierende, an die verschiedenen DNA-Einzelstränge bindende *primer* definiert ist. Dabei wird ein PCR-Reaktionsansatz (50 µl, beinhaltend: 100 ng DNA-*template*, 0,4 mM dNTPs, 2 x 0,2 µM *primer*, 0,5-1 U „*Phusion-High-Fidelity*“-DNA-Polymerase, 5 µl 10x-Reaktionspuffer) dem folgenden, mehrphasigen Temperaturverlaufsprotokoll mit 35 Zyklen der Schritte 2-4 unterzogen.

1) Initiale DNA-Denaturierung	94 °C - 98 °C	600 Sekunden
2) DNA-Denaturierung	94 °C - 98 °C	30 Sekunden
3) Hybridisierung der <i>primer</i>	<i>Primer</i> -spezifisch	10-30 Sekunden
4) Polymerisation	72 °C	<i>Template</i> -spezifisch
5) Polymerisation unvollständiger Stränge	72 °C	600 Sekunden
6) Probenkühlung	4 °C	-

Dabei bestimmt die Schmelztemperatur der verwendeten *primer* die Auswahl der Hybridisierungstemperatur der *Annealing*-Phase (Hybridisierung der *primer*), während die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments vor dem Hintergrund einer polymerasespezifischen Synthesegeschwindigkeit die Dauer der Elongationsphase (Polymerisation) bestimmt.

Die Aufreinigung von PCR-Amplifikaten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,5-2 Vol.-% Agarose in „TAE-Puffer“, Ethidiumbromidzusatz 1:30.000 oder 5 µl auf übliche 150 ml Gesamtvolumen, 30-60 Minuten Laufzeit bei 50-100 V Spannungsanlage), Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Licht und Ausschneiden der gewünschten DNA-Bande aus dem Gel. Anschließend erfolgte die DNA-Extraktion aus dem ausgeschnittenen Gelstück unter Verwendung des „*peqGOLD Gel Extraction Kits*“ gemäß den Herstellerangaben (siehe Abschnitt 2.1.1.2).

2.2.2.2 Klonierung

Ziel der Klonierung ist die Integration eines definierten DNA-Fragments in einen Vektor, der sich nach Transformation in einen kompetenten Wirtsorganismus (hier: DH5 α E. coli, kompetent durch Resuspension in „Inoue-Transformations-Puffer“ während der exponentiellen Wachstumsphase, siehe Abschnitt 2.1.1.4) gemeinsam mit der Wirts-DNA repliziert.

Dabei verfügt die ringförmige DNA-Struktur geeigneter Vektoren innerhalb der *multiple cloning site* (MCS) über sequenzdefinierte Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme, durch deren Verdau *sticky ends* entstehen. Durch PCR-Amplifikation des zu integrierenden DNA-Fragments mittels *primern*, die am 5'-Ende eine sich der Hybridisierungssequenz anschließende Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme besitzen, können PCR-Amplifikat und Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten werden, wodurch zueinander kompatible *sticky ends* entstehen.

Der Verdau von Vektor und amplifiziertem *insert* durch die gleichen zwei verschiedenen Restriktionsenzyme (10 U pro μ g DNA bei 100 % Enzymaktivität in verwendetem Puffer, Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur, Auswahl des Reaktionspuffers bei parallelem Verdau gemäß der Plattform „DoubleDigest“, Fa. ThermoScientific) ermöglicht nach Aufreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese und folgender DNA-Gelextraktion die Ligation von *insert* und Vektor: Das Mischen von verdaulichem und aufgereinigtem *insert* mit dem durch den Verdau linearisierten Vektor führt durch Zugabe der „T4-DNA-Ligase“ in entsprechendem Reaktionspuffer zur Ligation von Vektor und *insert*, ermöglicht durch kompatible *sticky ends*.

Die anschließende Transformation in chemisch kompetente E. coli DH5 α und deren Ausplattieren auf Ampicillin-haltigem Nährboden selektioniert Bakterien, die den wieder in Ringstruktur vorliegenden Vektor aufgenommen haben und so ein auf diesem kodiertes Resistenzgen exprimieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das TRIM9-Gen in den retroviralen Vektor „pMXs-Puro“ kloniert. Des Weiteren wurde ein Expressionsplasmid kloniert, das für C-terminal mittels mCherry fluoreszenzmarkiertes TRIM9 kodiert (siehe Abschnitt 2.1.2.3).

2.2.2.3 Mutations-*screening*: T7-Endonuklease-Verdau und Sequenzierung

Methodisches Prinzip

Zuvor mit dem CRISPR/Cas9-Plasmid transfizierte, herangewachsene Einzelzellklone wurden zuerst mittels eines T7-Endonuklease-Verdaus auf stattgefundene Mutationen innerhalb der CRISPR-Zielregion geprüft. Dabei nutzt die Methode als Grundprinzip die Fähigkeit der T7-Endonuklease, fehlgepaarte Basen innerhalb eines DNA-Doppelstranges zu erkennen und diesen dort zu schneiden. Nach DNA-Isolation und Amplifikation eines DNA-Fragments, das die CRISPR-Zielregion enthält, erfolgt das temperaturgesteuerte *reannealing* von WT-Amplifikaten und solchen zu prüfender CRISPR-Klone. Der anschließende T7-Endonuklease-Verdau erkennt dabei mutationsbedingte Fehlpaarungen, was durch das Auftreten zweier zusätzlicher Banden in einer anschließenden Agarose-Gelelektrophorese visualisiert werden kann.

Protokoll

Die DNA-Isolation heranwachsender CRISPR-Klone erfolgte aus dem 24-*well*-Format mittels Resuspension der Zellen in „*QuickExtractTM DNA Extraction Solution*“ und anschließender Erhitzung gemäß folgendem Temperaturprotokoll:

- | | | |
|----|-------|--------------|
| 1) | 68 °C | 900 Sekunden |
| 2) | 95 °C | 480 Sekunden |
| 3) | 4 °C | - |

Es folgte die PCR-Amplifikation im 50- μ l-Ansatz (Einsatz von 100 ng Ausgangs-DNA, 2 μ l dNTPs, 0,3 μ l „Phusion HF-Polymerase“ inklusive mitgeliefertem HF-Puffer, Konzentrationen der *primer* jeweils 1 μ M) nach folgendem Temperaturprotokoll mit 35 Zyklen der Schritte 2-3:

- | | | |
|----|-------|--------------|
| 1) | 98 °C | 300 Sekunden |
| 2) | 98 °C | 10 Sekunden |
| 3) | 72 °C | 30 Sekunden |
| 4) | 72 °C | 300 Sekunden |
| 5) | 4 °C | - |

Der Einsatz von 15 μ l der jeweiligen PCR-Amplifikate in einer Agarose-Gelelektrophorese (Laufzeit 30 Minuten bei 80 V, 1,5 Vol.-% Agarose in TAE-Puffer inklusive Ethidiumbromid 1:30.000, entspricht 5 μ l auf übliche 150 ml Gesamtvolumen) diente durch Visualisierung der erwarteten Bande auf Höhe von 600 Nukleotiden als Funktionskontrolle der PCR. Es folgte das Mischen von jeweils 30 μ l WT-Amplifikat mit entsprechenden PCR-Amplifikaten der CRISPR-Klone und das *reannealing* nach folgendem Temperaturprotokoll:

- | | | |
|----|-------|--------------|
| 1) | 95 °C | 600 Sekunden |
| 2) | 85 °C | 1 Sekunde |
| 3) | 25 °C | 1 Sekunde |
| 4) | 4 °C | - |

Der T7-Endonuklease-Verdau (1 μ l T7-Endonuklease inklusive mitgeliefertem Puffer für 3 Stunden bei 37 °C) des 60- μ l-Mischansatzes und die anschließende Agarose-Gelelektrophorese nach oben beschriebenem Schema zeigten Mutationen durch das Auftreten zwei zusätzlicher Banden entsprechend einer Länge von circa 200 und 400 Nukleotiden an (siehe Abb. 2.2.5).

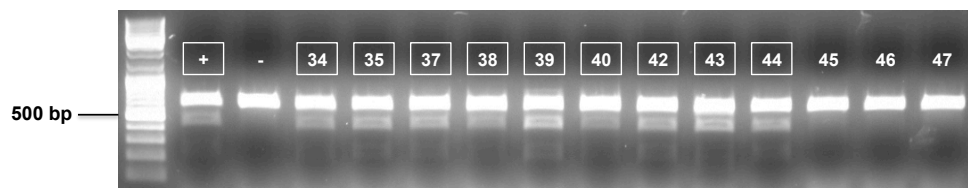


Abbildung 2.2.5: Exemplarische Illustration des T7-Endonuklease-screenings einiger ¹²⁰⁵Lu-CRISPR-Klone. Neben der Positivkontrolle zeigen die umrahmten Proben durch das Auftreten zusätzlicher Banden entsprechend einer Länge von circa 200 und 400 Nukleotiden Mutationen in der CRISPR-Zielregion an.

DNA der auf diese Art positiv getesteten CRISPR-Klone wurde erneut für die PCR-Amplifikation der CRISPR-Zielregion nach selbigem Schema verwendet. Es folgte die Amplifikataufreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion aus dem entsprechenden Bereich des Agarose-Gels (Verwendung des „peqGOLD *Gel Extraction Kits*“ gemäß der Herstellerangaben, siehe Abschnitt 2.1.1.2). Durch eine externe Firma konnte nach Zugabe des bereits für die PCR verwendeten *forward-primers* zum aufgereinigten PCR-Amplifikat die CRISPR-Zielregion sequenziert werden (siehe z. B. Abb. 3.2.4).

2.2.2.4 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Methodisches Prinzip

Zur Transkriptionsniveaubestimmung verschiedener Gene wurden deren RNA-Transkripte nach Umschrieb in cDNA mittels qRT-PCR quantifiziert. Dabei folgt die spezifische Quantifizierung verschiedener cDNA-Sequenzen dem Grundprinzip einer Polymerase-Kettenreaktion, wobei im Gegensatz zur herkömmlichen PCR ein der Menge des PCR-Produkts proportionales Fluoreszenzsignal detektiert werden kann.

Dabei entsteht das Fluoreszenzsignal durch die Zugabe von Hybridisierungssonden (siehe Abschnitt 2.1.2.5) zum konventionellen PCR-Reaktionsansatz. Diese beinhalten *locked nucleic acids (LNAs)*, Oligonukleotide einer Länge von 8-9 Nukleotiden, die im Vergleich zu herkömmlich als *primer* eingesetzten Oligonukleotiden über eine 2'O-4'C-verbindende Methylenbrücke an jedem Ribosemolekül verfügen und weiterhin am 5'-Ende an Fluoreszein sowie am 3'-Ende an einen *quencher* gebunden sind. So wird zum einen durch die Zuckermodifikation eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur zum cDNA-*template* erreicht, die sich so jener von den deutlich längeren *primern* annähert. Zum anderen erhöht die Zuckermodifikation die Bindungsspezifität der Sonden zur komplementären cDNA-Sequenz.

In der *Annealing*-Phase der Polymerase-Kettenreaktion lagert sich neben den *primern* ebenso die Sonde an einen zwischen den *Primer*-Bindungsstellen liegenden cDNA-Sequenzabschnitt an. Während der darauffolgenden Elongationsphase amplifiziert eine DNA-Polymerase das cDNA-*template* und baut die dazwischenliegende Hybridisierungssonde mittels 5'-3'-Exonukleaseaktivität ab, wodurch zuvor durch *LNAs* verbundene *quencher* und Fluoreszeine voneinander getrennt werden. Der dadurch auftretende Verlust der inhibitorischen Wirkung der *quencher* auf benachbarte Fluoreszeine ermöglicht so am Ende jeder Elongationsphase eine Zunahme der Fluoreszenzemission. Die Intensität des Fluoreszenzsignals, das in zyklusdiskreten Zeitabständen gemessen wird, verhält sich somit proportional zur cDNA-Konzentration zu Beginn des jeweiligen Amplifikationszyklus.

Die Quantifikationsanalyse erfolgt auf Basis des *threshold cycle* (CT-Wert) als Angabe jenes Amplifikationszyklus, in dem das Fluoreszenzsignal erstmals signifikant über das Hintergrundrauschen steigt und der somit den Beginn der exponentiellen Reaktionsphase darstellt. Die relative Quantifizierung erfolgt dabei relativ zur mRNA-Expression von Referenzgenen (β -Aktin, GAPDH, HPRT) derselben Probe gemäß

$$Target/Ref. = \frac{Primereffizient(Ref.)^{CT(Ref.)}}{Primereffizienz(Target)^{CT(Target)}}. \quad (1)$$

Protokoll

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe des „*peqGOLD Total RNA Kit*“ (siehe Abschnitt 2.1.1.2) entsprechend den Herstellerangaben.

Im Anschluss wurden 100 ng RNA im 20-µl-Ansatz (inklusive 1 mM dNTPs, 1 µM Oligo-dTs, 0,5 µl Riboblock, 0,2 µl Reverse Transkriptase inklusive mitgeliefertem Puffer) bei 42 °C für eine Stunde in cDNA umgeschrieben. Es folgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 70 °C für zehn Minuten, die Probenkühlung auf 4 °C und die Verdünnung (1:1) der cDNA-Proben in nukleasefreiem Wasser.

Die in Triplikaten durchgeführte qRT-PCR erfolgte anschließend jeweils im 10-µl-Ansatz, beinhaltend 5 µl MasterMix (siehe Abschnitt 2.1.1.3), 20 µM *primer* sowie 0,1 µl der entsprechenden Sonde (siehe Abschnitt 2.1.2.5) entsprechend dem folgenden Temperaturprotokoll mit 45 Zyklen der Schritte 2-3:

- | | | |
|----|-------|--------------|
| 1) | 95 °C | 600 Sekunden |
| 2) | 95 °C | 10 Sekunden |
| 3) | 60 °C | 30 Sekunden |
| 4) | 40 °C | 30 Sekunden |

Die zyklusabhängig auftretende Fluoreszenzdetektion gewährleistete dabei der verwendete „*Light-Cycler 480 II*“ (siehe Abschnitt 2.1.1.1), mit Hilfe dessen Software im Anschluss die relative Transkriptquantifizierung verschiedener Zielgene relativ zu gemessenen *Houskeeping*-Genen (β -Aktin, GAPDH, HPRT) erfolgte.

2.2.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse basiert im Rahmen dieser Arbeit auf der Varianzdarstellung als Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of the mean*, SEM). Diese Angabe ist bei Experimenten, die in Replikaten durchgeführt worden sind, jedoch nicht als vollständig unabhängiges Experiment wiederholt wurden, als methodischer Fehler zu interpretieren.

Experimente, die mindestens einmal vollständig wiederholt wurden, sind durch Angabe der Wiederholungen (n=2,3,4,5...) gekennzeichnet. Die Fehlerangabe erfolgt hier durch die Darstellung als SEM auf Basis aller unabhängig durchgeführten Experimente. Bei mindestens drei Wiederholungen erfolgte die Signifikanzanalyse (auf Basis der jeweiligen Mittelwerte unabhängiger Experimentdurchläufe) durch einen zweiseitigen, wenn möglich gepaarten Student *t-Test* beziehungsweise unter der Annahme nicht normalverteilter biologischer Messwerte durch einen zweiseitigen *Mann-Whitney-U-Test* (durch die Software „*GraphPad Prism*“) unter Verwendung der Signifikanzniveaus $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***). Die Angabe von Signifikanzniveaus berücksichtigt daher den biologischen Fehler.

3 Ergebnisse

3.1 Beeinflussung des TRIM9-Expressionsniveaus

Abschnittsüberblick	Seite
3.1.1 Der SNP rs12879906 in der TRIM9-3'UTR beeinflusst die TRIM9-Genexpression	43
3.1.2 Die Aktivierung des TLR3-Signalweges sowie die Stimulation mit Interferon- β und Interferon- γ führt zu einer verminderten Expression von TRIM9 . . .	45

3.1.1 Der SNP rs12879906 in der TRIM9-3'UTR beeinflusst die TRIM9-Genexpression

Neben der im Rahmen der Genexpressionsregulation besser bekannten Promotorregion, welche die Transkription eines Gens kontrolliert, beeinflussen ebenso die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) sowie die 5'-untranslatierte Region (5'UTR) der *messengerRNA* (mRNA) die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene.

So basiert der regulative Einfluss der auf der DNA 5'-gelegenen Promotorregion in erster Linie auf der Wechselwirkung mit Transkriptionsfaktoren, die für die Rekrutierung der RNA-Polymerase und damit für die Initiation der Transkription zuständig sind. Über die Promotorregion wird damit primär die Synthese der mRNA reguliert.

Neben dem später translatierten Bereich der mRNA, welcher durch Start- und Stop-*codon* repräsentierende Basentriplets definiert ist, wird im Rahmen der Gentranskription ebenso der 5'-gelegene Bereich zwischen Promotorregion und Start-*codon* sowie der 3'-gelegene Bereich zwischen Stop-*codon* und poly-A-Abschnitt transkribiert. Diese Bereiche repräsentieren auf mRNA-Ebene die 3'UTR sowie die 5'UTR, welche zur posttranskriptionellen Genregulation beitragen. 3'UTR und 5'UTR spielen dabei eine Rolle für die Stabilität und Halbwertszeit der mRNA, beeinflussen die räumliche Struktur der mRNA und vermitteln Wechselwirkungen mit *microRNAs* (miRNA).

So wurden 1993 erstmalig die heute als *microRNA* (miRNA) bekannten RNA-Fragmente einer Länge von circa 22 Basenpaaren beschrieben, die eine *Antisense*-Komplementarität zur 3'UTR anderer Gene haben und durch RNA-Interferenz mit entsprechenden mRNAs diese abbauen oder deren Translation inhibieren können [Bartel, 2004; Lee et al., 1993].

Wie in der Einleitung in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, sind die Allele „A/T“ *versus* „G/C“ des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs12879906 an Basenposition 1379 der 3'UTR von TRIM9 mit einer veränderten Chronifizierungsrate einer Hepatitis-C-Infektion assoziiert. Um zu untersuchen,

ob die Allele dieses SNPs die Expression von TRIM9 differentiell beeinflussen, wurde ein auf *Gaussia*-Luciferase (GLuc) und sezernierter alkalischer Phosphatase (seAP) beruhender Reporter-*assay* verwendet. Dazu wurden wie im Abschnitt 2.2.1.7 des Methodenteils beschrieben zwei Reporterplasmide generiert, in denen die ersten 2026 Basenpaare der 3'UTR von TRIM9 hinter die kodierende Region der *Gaussia*-Luciferase kloniert wurden und die sich nur an dem der SNP entsprechenden Base 1379 der 3'UTR unterschieden.

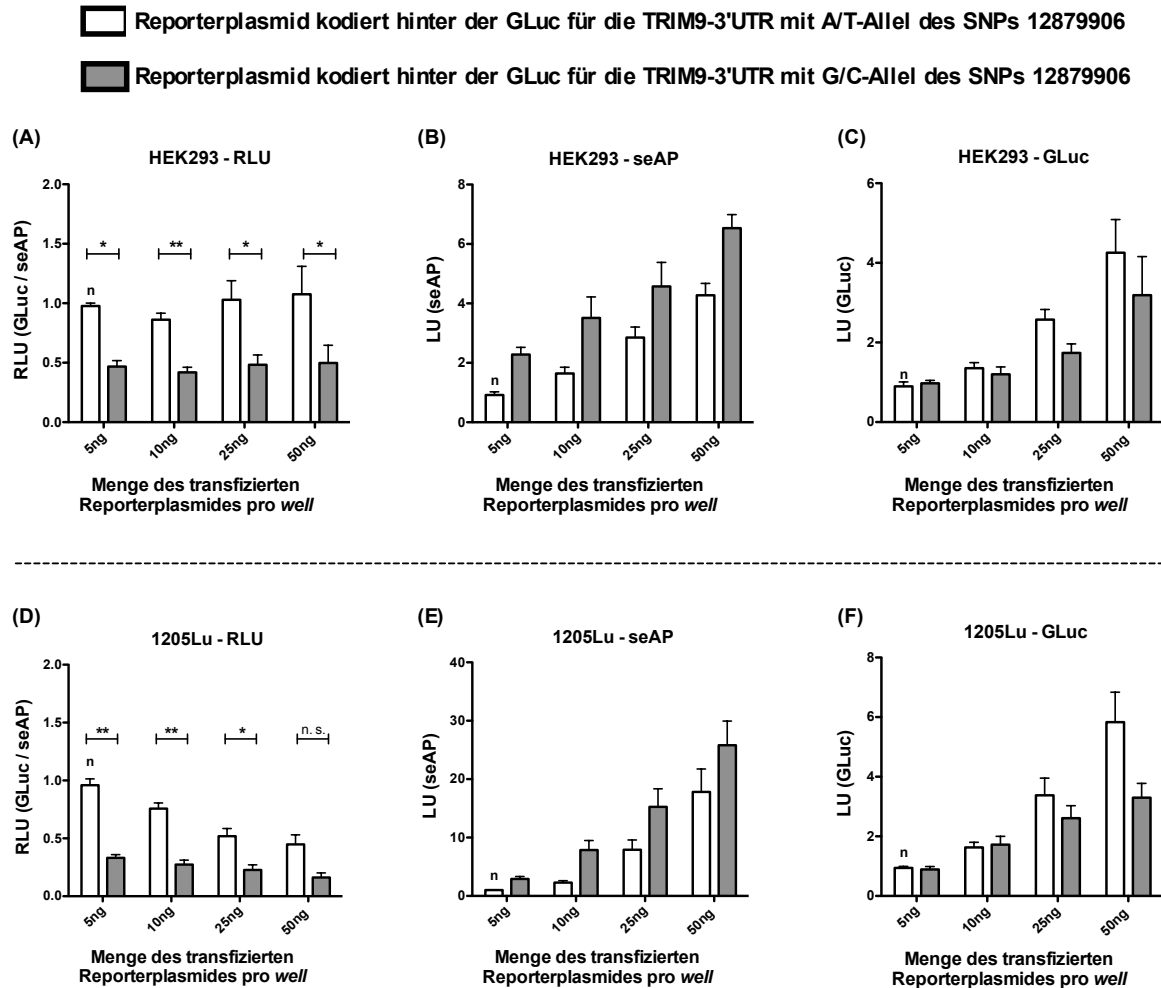


Abbildung 3.1.1: Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs12879906 in der 3'UTR beeinflusst die Genexpression der 5'-lokalisierten, kodierenden Region von TRIM9. Die Zelllinien HEK293^{*1} (25.000 Zellen pro *well*) und 1205Lu (30.000 Zellen pro *well*) wurden im 96-*well*-Format ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit den angegebenen Mengen eines Luciferase-Reporterplasmids transfiziert, das die 3'UTR von TRIM9 entweder mit dem A/T-Allel oder dem G/C-Allel des SNPs rs12879906 enthält. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Mengen der sezernierten GLuc sowie als Transfektionseffizienzkontrolle die Mengen der sezernierten alkalischen Phosphatase nach Substratzugabe mittels Chemolumineszenz bestimmt. Die Daten wurden jeweils auf den mit „n“ markierten Messwert normiert und sind als Mittelwerte +SEM dargestellt; n=4 (für A-C), n=3 (für D-F). Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test bestimmt und sind angegeben als *=p<0.05, **=p<0.01, n.s.=nicht signifikant.

^{*1}In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HEK293-WT-Zelllinien verwendet, siehe Abschnitt 3.2.3 und Tab. 1

Wie in Abbildung 3.1.1 gezeigt, führt die Transfektion des A/T-Allel-enthaltenden Konstrukts zu einer konstant höheren Expression des davor gelegenen Luciferase-Gens als die G/C-Allel-enthaltende Variante. Dies konnte sowohl in HEK293*¹-Zellen als auch in der Melanomzelllinie 1205Lu gezeigt werden. Demnach bedingt die Basenpaarung „A/T“ gegenüber der höher prävalenten Basenpaarung „G/C“ an Position 1379 der TRIM9-3'UTR eine gesteigerte Expression des 5'-gelegenen Gens in den Zelllinien HEK293*¹ und 1205Lu (siehe Abb. 3.1.1, A/D). Zwar zeigt sich hierbei auch ein Unterschied hinsichtlich der sezernierten alkalischen Phosphatase (seAP), was auf verschiedene Transfektionseffizienzen der Reporterplasmide hinweist, jedoch findet sich dieser Unterschied in selbiger Abweichung nicht in der Expression der GLuc wieder (siehe Abb. 3.1.1, B/C/E/F).

Es konnte damit in diesem Modellsystem gezeigt werden, dass der mit einer veränderten HCV-Chronifizierungsrate assoziierte Einzelnukleotidpolymorphismus innerhalb der 3'UTR des TRIM9-Gens das Expressionsniveau eines 5'-gelegenen Gens beeinflusst und damit mutmaßlich in gleichem Maße die natürliche TRIM9-Expression beeinflusst. Dabei scheint das mit einer erhöhten Ausheilungschance korrelierte SNP-Allel zugleich mit einer gesteigerten Expression des 5'-gelegenen Gens assoziiert zu sein (siehe Abb. 3.1.1 und Tab. 1.3.1). Ob dieser Effekt durch einen SNP-abhängigen Unterschied hinsichtlich der Interferenz mit miRNAs, durch räumlich-strukturelle Unterschiede der mRNA in Abhängigkeit von dem SNP oder durch eine anderweitig affizierte Halbwertszeit der mRNA bedingt ist, wurde bisher nicht weiter geklärt.

3.1.2 Die Aktivierung des TLR3-Signalweges sowie die Stimulation mit Interferon- β und Interferon- γ führt zu einer verminderten Expression von TRIM9

Weiterhin wurde überprüft, ob die TRIM9-Expression konstant ist oder im Rahmen einer innaten, antiviralen Immunantwort reguliert wird. So wurde mittels qRT-PCR das Expressionsniveau von TRIM9 nach Aktivierung der Rezeptoren RIG-I, MDA5 und TLR3 sowie nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- β und Interferon- γ bestimmt.

Während Triphosphat-RNA (Ligand von RIG-I) sowie Interferon- β und Interferon- γ als spezifische Liganden ihrer Rezeptoren anzusehen sind, ist pI:C als einziger gut definierte Ligand des intrazellulären Rezeptors MDA5 gleichzeitig auch ein Ligand des endosomalen Rezeptors TLR3. Während TLR3 durch die Zugabe von pI:C zum Medium stimuliert werden kann, bedarf die Aktivierung von MDA5 den Transport von pI:C ins Zytoplasma mit Hilfe eines Transfektionsreagenz. Um die MDA5-Spezifität der Stimulation mit transfiziertem pI:C für die MDA5-Aktivierung zu erhöhen, wurde der endosomal lokalisierte TLR3 zugleich mittels Chloroquin blockiert. Dabei akkumuliert Chloroquin in Endosomen und Lysosomen und inhibiert durch Milieualkalisierung die Aktivierung dort lokalisierter TLRs [Rutz et al., 2004; Shintani and Klionsky, 2004]. Abbildung 3.1.2 zeigt, dass die komplette durch TLR3 induzierte Immunantwort nach Zugabe von pI:C ohne Transfektionsreagenz zum Zellmedium durch Chloroquin inhibiert werden kann. Weiterhin konnte eine partielle Chloroquin-vermittelte Verminderung der Immunantwort auch nach Transfektion von pI:C demonstriert werden, sodass von einer Steigerung der MDA5-Spezifität durch Zugabe von Chloroquin ausgegangen werden kann (siehe Abb. 3.1.3).

¹In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HEK293-WT-Zelllinien verwendet, siehe Abschnitt 3.2.3 und Tab. 1

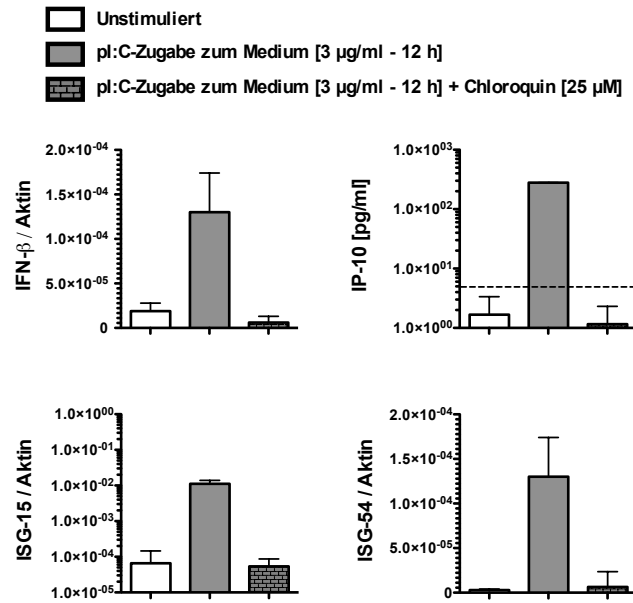


Abbildung 3.1.2: Die Zugabe von Chloroquin zum Zellmedium blockiert die TLR3-vermittelte Immunantwort. Nach Ausplattieren von 100.000 1205Lu-WT-Zellen pro *well* im 24- *well*-Format erfolgte am nächsten Tag die Zugabe von Chloroquin (25 µM) sowie mit zweistündigem Zeitverzug die Zugabe von HMW pI:C (3 µg/ml) zum vorbestehenden Medium. Nach 12 Stunden erfolgte die Entnahme von Überständen und die RNA-Isolation. Die pI:C-vermittelte Induktion von ISG-15, ISG-54 sowie Interferon-β wurde mittels qRT-PCR relativ zu β-Aktin als *Housekeeping*-Gen bestimmt; die Sekretion von IP-10 wurde mittels ELISA quantifiziert (die gestrichelte Linie stellt hierbei die Detektionsgrenze des ELISA dar). Die qRT-PCR sowie der ELISA wurden in Triplikaten durchgeführt; angegeben sind Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler). Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

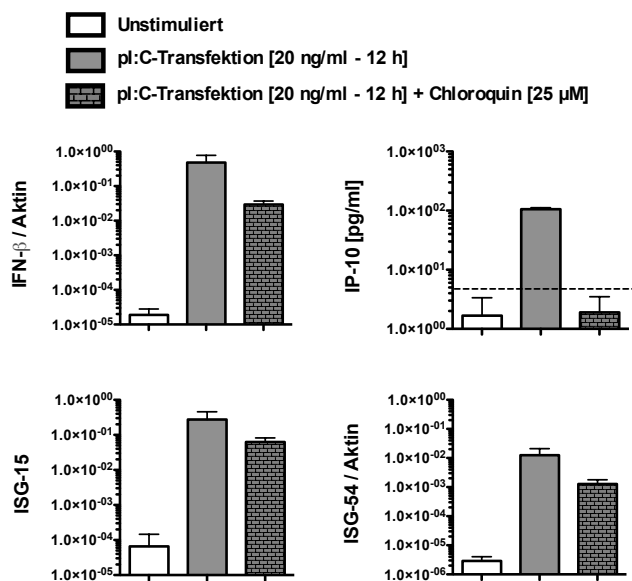


Abbildung 3.1.3: Die Zugabe von 25 µM Chloroquin vor der Transfektion von HMW pI:C reduziert die Immunantwort durch Blockade von TLR3 und erhöht damit die MDA5-Spezifität der Stimulation. Nach Ausplattieren von 100.000 1205Lu-WT-Zellen pro *well* im 24-*well*-Format erfolgte am nächsten Tag die Transfektion von 20 ng HMW pI:C (+/- Zugabe von 25 µM Chloroquin ins Zellmedium zwei Stunden vor der Stimulation). Die Induktion von ISG-15, ISG-54 sowie Interferon-β wurde mittels qRT-PCR relativ zu β-Aktin als *Housekeeping*-Gen bestimmt; die Sekretion von IP-10 wurde mittels ELISA quantifiziert (die gestrichelte Linie stellt hierbei die Detektionsgrenze des ELISA dar). Die qRT-PCR sowie der ELISA wurden in Triplikaten durchgeführt; angegeben sind Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler). Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

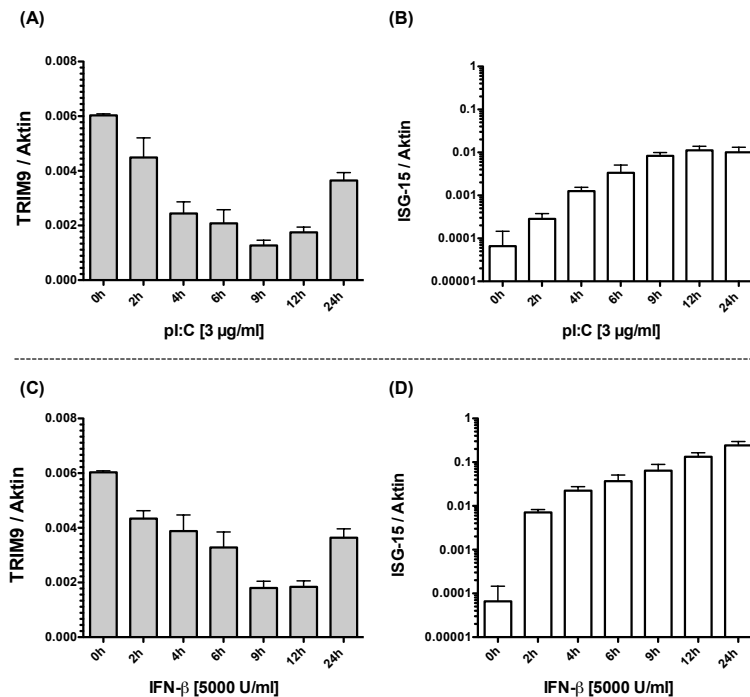


Abbildung 3.1.4: Die TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene wird nach Stimulation mit Interferon- β sowie der Aktivierung von TLR3 vermindert. Nach Ausplattieren von 100.000 1205Lu-WT-Zellen pro *well* im 24-*well*-Format erfolgte am nächsten Tag die Stimulation mit rekombinantem Interferon- β (5000 U/ml) oder die Aktivierung von TLR3 durch Zugabe von HMW pI:C (3 µg/ml) ins Zellmedium. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Expression von ISG-15 (als Stimulationskontrolle) sowie von TRIM9 wurde nach RNA-Isolation mittels qRT-PCR relativ zum *Housekeeping*-Gen β -Aktin quantifiziert. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt; angegeben sind Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler). Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

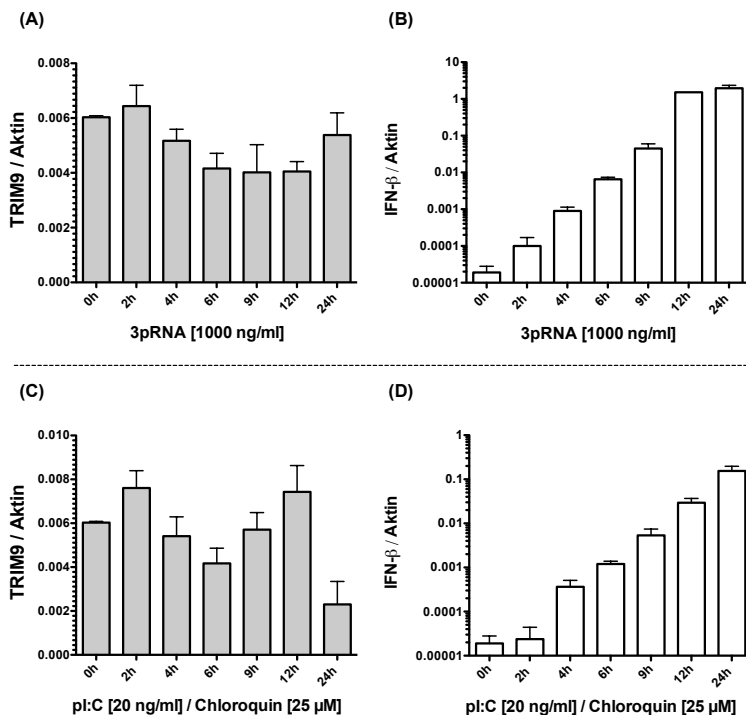


Abbildung 3.1.5: Die TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene wird durch die Stimulation von RIG-I sowie MDA5 nicht eindeutig beeinflusst. Nach Ausplattieren von 100.000 1205Lu-WT-Zellen pro *well* im 24-*well*-Format erfolgte am nächsten Tag die Aktivierung von RIG-I (Transfektion von 1000 ng/ml 3pRNA) sowie MDA5 (Transfektion von 20 ng/ml HMW pI:C nach vorheriger Zugabe von 25 µM Chloroquin zum vorbestehenden Medium). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Expression von Interferon- β (als Stimulationskontrolle) sowie von TRIM9 wurde nach RNA-Isolation mittels qRT-PCR relativ zum *Housekeeping*-Gen β -Aktin quantifiziert. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt; angegeben sind Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler). Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

Unter Verwendung der so etablierten Stimulationsbedingungen wurde die Expression von TRIM9 nach spezifischer Aktivierung oben genannter Rezeptoren im Zeitverlauf mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene quantifiziert. Dabei zeigte sich nach Aktivierung von TLR3 sowie nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- β eine Herunterregulation von TRIM9 mit der Tendenz einer nach 9-12 Stunden wieder in Richtung des Ausgangsniveaus ansteigenden TRIM9-Expression (siehe Abb. 3.1.4). Die Tendenz einer geringfügigen Herunterregulation von TRIM9 war ebenfalls nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- γ nachweisbar (siehe Abb. 3.1.6), während die Aktivierung von RIG-I und MDA5 keinen eindeutigen Einfluss auf die TRIM9-Expression zeigte (siehe Abb. 3.1.5).

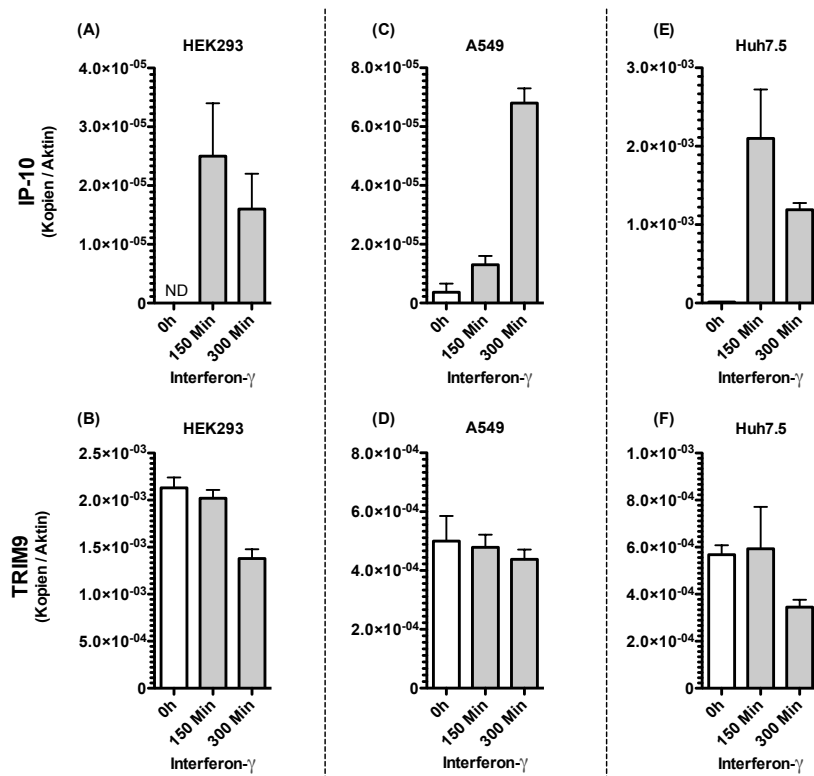


Abbildung 3.1.6: Die Stimulation mit rekombinantem Interferon- γ führt zu einer geringfügigen Suppression der TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene. Nach Ausplattieren von 70.000 HEK293-Zellen¹ pro well (A/B), 70.000 A549-Zellen pro well (C/D) beziehungsweise 150.000 Huh7.5-Zellen pro well (E/F) in 24-well-Flachbodenplatten erfolgte am nächsten Tag die Stimulation durch Zugabe von rekombinantem Interferon- γ (1000 iU/ml). 150 und 300 Minuten nach Stimulation wurden die Zellen lysiert und RNA isoliert. Die Expression von IP-10 (als Stimulationskontrolle) sowie von TRIM9 wurde mittels qRT-PCR relativ zum *Housekeeping*-Gen β -Aktin bestimmt. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt; angegeben sind Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler). Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

Weiterhin wurde überprüft, ob die Aktivierung verschiedener im Rahmen von Virusinfektionen relevanter Signalwege zu einer posttranskriptionellen Genregulation über die TRIM9-3'UTR (dabei gegebenenfalls in Abhängigkeit von dem SNP rs12879906, siehe Abschnitte 1.3.1 und 3.1.1) beiträgt. In diesem Zusammenhang diente die relative GLuc-Expression (RLU) der bereits in Ab-

¹In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HEK293-WT-Zelllinien verwendet, siehe Abschnitt 3.2.3 und Tab. 1

schnitt 3.1.1 verwendeten Reporterplasmide als *read-out* einer durch die TRIM9-3'UTR regulierten Genexpression. Unter Verwendung der Zelllinie HEK293*¹ folgte auf die Transfektion der Reporterplasmide mit einem Zeitverzug von 90 Minuten die Zugabe verschiedener Stimulantien. Die Effizienz der Stimulationskonditionen ist als Kontrolle in Abbildung 3.1.7 dargestellt: Die Transfektion von 3pRNA sowie die Infektion mit VSV-M51R induziert die mittels ELISA quantifizierte Sekretion von IP-10 (siehe Abb. 3.1.7, A), die Stimulation mit TNF- α sowie PMA führt zu einer mittels Luciferase-*assay* quantifizierten Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (siehe Abb. 3.1.7, B) und die Stimulation mit Interferon- β sowie Interferon- γ führt zu einer mittels Luciferase-*assay* quantifizierten Aktivierung des ISRE-Promotors (siehe Abb. 3.1.7, C/D).

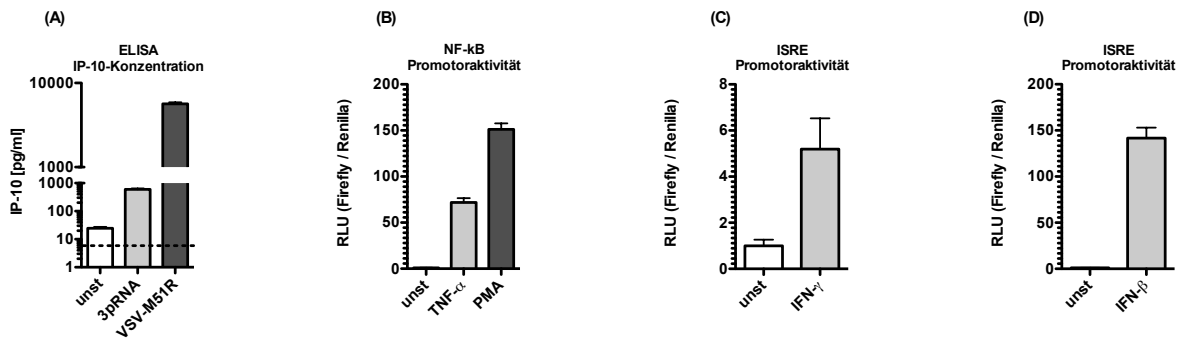


Abbildung 3.1.7: Darstellung der Stimulationseffizienzen der in Abb. 3.1.8 verwendeten Stimulationskonditionen: Die Transfektion von 3pRNA sowie die Infektion mit VSV-M51R induziert die Sekretion von IP-10 (A). Die Stimulation mit TNF- α oder PMA aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B (B). Die Stimulation mit rekombinantem Interferon- β und Interferon- γ führt zu einer Aktivierung des ISRE-Promotors (C-D). (A): 25.000 HEK293*-Zellen¹ wurden pro *well* in einer 96-*well*-Platte ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit den in Abb. 3.1.8 angegebenen Mengen eines Luciferase-Reporterplasmids transfiziert, das die 3'UTR von TRIM9 enthält. Nach weiteren 90 Minuten wurden die Zellen mit 3pRNA (1000 ng/ml) transfiziert oder mit VSV-M51R (Mol 0,1) infiziert. Nach 24 Stunden wurde aus dem Zellüberstand mittels ELISA die Menge des sezernierten IP-10 quantifiziert (hier dargestellt). Der Überstand wurde weiterhin zur Chemolumineszenzdetektion der sezernierten Luciferasen verwendet (dargestellt in Abb. 3.1.8). (B-D): 25.000 HEK293*-Zellen¹ wurden pro *well* in einer 96-*well*-Platte ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen pro *well* mit 40 ng eines NF- κ B- oder ISRE-Reporterplasmids (*Firefly*-Luciferase) sowie zugleich mit 40 ng eines konstitutiv aktiven Reporterplasmids (*Renilla*-Luciferase) als Transfektionseffizienzkontrolle transfiziert. Nach weiteren 90 Minuten erfolgte die Zugabe von TNF- α (10 ng/ml), PMA (100 ng/ml), Interferon- β (6000 iU/ml) oder Interferon- γ (1000 iU/ml) zum vorbestehenden Medium. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Menge der exprimierten *Firefly*-Luciferase wurde relativ zur exprimierten *Renilla*-Luciferase als RLU auf Lumineszenzbasis gemessen. (A-D): Jede Stimulationskondition wurde in Triplikaten durchgeführt, jedoch nicht als vollständig unabhängiges Experiment zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) dargestellt. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

Die so etablierten Stimulationskonditionen wurden verwendet, um deren Einfluss auf eine durch die 3'UTR des TRIM9-Gens vermittelte, posttranskriptionelle Genexpressionsregulation zu prüfen. Bei Betrachtung der hinsichtlich des SNPs rs12879906 differentiellen Expression der GLuc zeigte sich für verschiedene Mengen transfizierter Reporter im unstimulierten Zustand erneut die durch das SNP-Allel „A/T“ verstärkte Expression der 5'-kodierte GLuc. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass

¹In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HEK293-WT-Zelllinien verwendet, siehe Abschnitt 3.2.3 und Tab. 1

der SNP-abhängige Expressionsunterschied der GLuc über alle Stimulationsbedingungen hinweg stabil erhalten bleibt (siehe Abb. 3.1.8). Bezüglich der Stimulation mit rekombinantem Interferon- β , der Aktivierung von RIG-I mittels transfizierter 3pRNA als auch hinsichtlich der Infektion mit VSV-M51R ist kein eindeutiger Effekt auf die relative Expression der GLuc zu messen gewesen, während insbesondere eine Stimulation mit TNF- α die relative Expression der GLuc für beide SNP-Allele gleichermaßen steigerte (siehe Abb. 3.1.8).

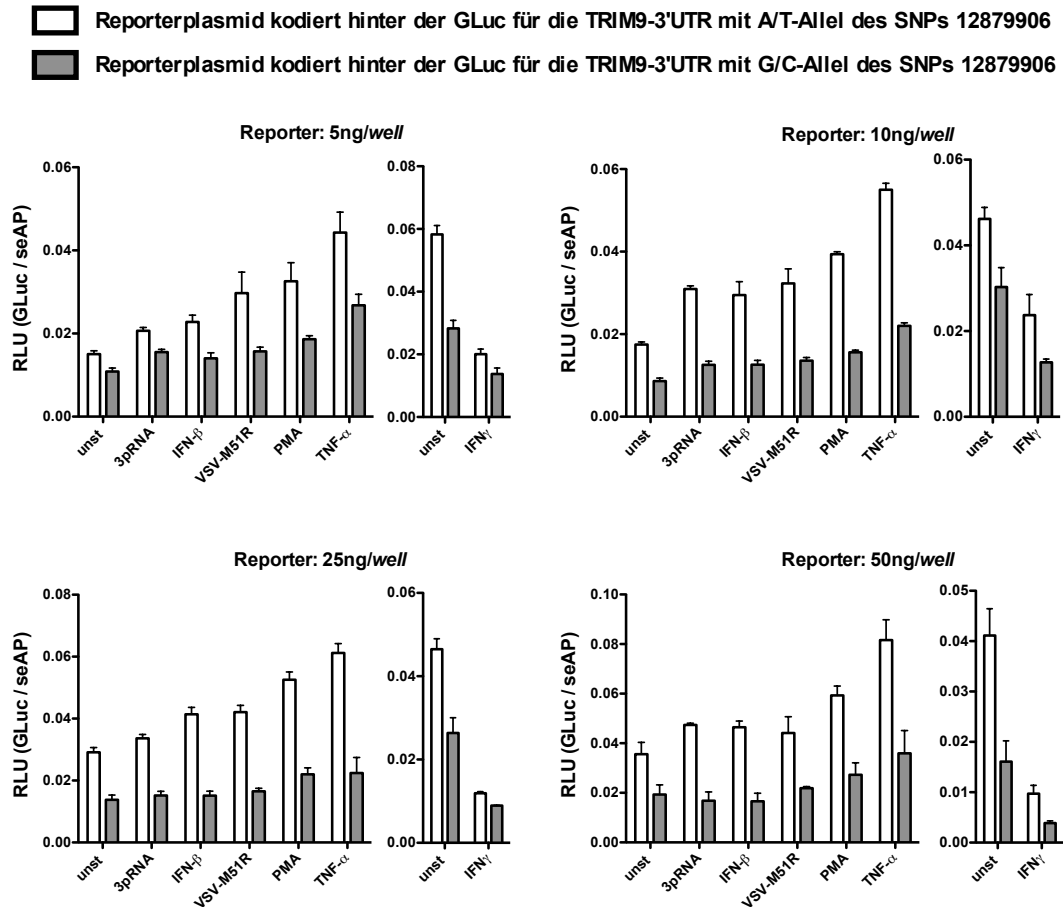


Abbildung 3.1.8: Interferon- γ hemmt über die 3'UTR posttranskriptionell die Expression von TRIM9 unabhängig davon, welches SNP-Allel an rs12879906 vorliegt. Es wurden 25.000 HEK293*-Zellen¹ pro well in einer 96-well-Flachbodenplatte ausplattiert. Am Folgetag wurden die Zellen mit den angegebenen Mengen eines Luciferase-Reporterplasmids transfiziert, das die 3'UTR von TRIM9 entweder mit dem A/T-Allel oder G/C-Allel des SNPs rs12879906 enthält. Nach weiteren 90 Minuten wurden die Zellen mit den angegebenen Stimulantien aktiviert: VSV-M51R (Mol 0,1), Interferon- β (6000 iU/ml), Interferon- γ (1000 iU/ml), 3pRNA (1000 ng/ml, transfiziert), PMA (100 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml). 24 Stunden nach der Stimulation wurde die Menge der sezernierten GLuc sowie als Transfektionseffizienzkontrolle die Menge der sezernierten alkalischen Phosphatase nach entsprechender Substratzugabe mittels Chemolumineszenz bestimmt. Die Daten wurden jeweils als RLUs (Verhältnis GLuc/seAP) angegeben und sind als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) dargestellt. Alle Konditionen des Experiments wurden in Triplikaten durchgeführt. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei nicht zu unabhängigen Zeitpunkten durchgeführten Wiederholungen ($n=1$) nicht.

¹In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HEK293-WT-Zelllinien verwendet, siehe Abschnitt 3.2.3 und Tab. 1

Nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- β ließ sich keine Reduktion der GLuc-Expression als Reporter einer TRIM9-3'UTR-vermittelten Genregulation nachweisen (siehe Abb. 3.1.8). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die in Abbildung 3.1.4 demonstrierte Herunterregulation von endogenem TRIM9 nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- β transkriptionell und nicht posttranskriptionell über die 3'UTR vermittelt wird.

Weiter zeigte sich eine reduzierte GLuc-Expression insbesondere nach Stimulation mit Interferon- γ . Dabei reduzierte die Stimulation mit Interferon- γ die Expression der GLuc für beide SNP-Allele gleichermaßen (siehe Abb. 3.1.8). Es ist in diesem Zusammenhang naheliegend, dass an der geringfügigen Herunterregulation des endogenen TRIM9 nach Stimulation mit Interferon- γ (insbesondere in HEK293, siehe Abb. 3.1.6) die 3'UTR von TRIM9 regulativ beteiligt ist. Eine Interferon- γ -vermittelte Expressionsregulation von TRIM9 wäre weiterhin konsistent mit der nach Carthagena et al. beschriebenen Suppression von TRIM9 im Rahmen der Stimulation primärer Makrophagen mit Interferon- γ [Carthagena et al., 2009].

Es konnte damit zusammenfassend gezeigt werden, dass die Expression von TRIM9 im Rahmen der Stimulation mit rekombinantem Interferon- β und Interferon- γ sowie der Aktivierung von TLR3 herunterreguliert wird. Dabei scheint die Genregulation nach Stimulation mit Interferon- γ über die 3'UTR von TRIM9 vermittelt zu sein, hier jedoch von dem erwähnten SNP rs12879906 unbeeinflusst. An der Herunterregulation von TRIM9 nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- β konnte keine Beteiligung der 3'UTR demonstriert werden.

3.2 Etablierung stabiler Zelllinien mit *knock-out* beziehungsweise Überexpression von TRIM9

Abschnittsüberblick	Seite
3.2.1 CRISPR/Cas9: Etablierung TRIM9-defizienter Zellmodelle	52
3.2.1.1 Zelllinie 1205Lu	53
3.2.1.2 Zelllinie A549	56
3.2.1.3 Zelllinie Huh7.5	58
3.2.2 Retrovirale Transduktion: Etablierung stabil TRIM9-überexprimierender Zelllinien	58
3.2.3 STR-Analyse etablierter Einzelzellklone	60

Um den Einfluss veränderter Expressionsniveaus von TRIM9 auf den Verlauf von Virusinfektionen untersuchen zu können, wurden mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung (siehe Abschnitt 2.2.1.4) stabile TRIM9-*knock-out*-Zelllinien (TRIM9-/-, TRIM9-KO) sowie mittels retroviraler Transduktion (siehe Abschnitt 2.2.1.3) Zelllinien mit stabiler TRIM9-Überexpression auf Basis der Zelllinien HEK293, 1205Lu, A549 sowie Huh7.5 etabliert. Im Folgenden ist die Charakterisierung jener Expressionsmodelle dargestellt, deren Zelllinienzugehörigkeit mittels Analyse des Profils ihrer *short tandem repeats* (STR) eindeutig bestätigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.2.3) und die in den präsentierten Experimenten verwendet wurden.

3.2.1 CRISPR/Cas9: Etablierung TRIM9-defizienter Zellmodelle

Das *screening* der nach CRISPR/Cas9-Geneditierung heranwachsenden Einzelzellklone auf mögliche *knock-outs* von TRIM9 und die Charakterisierung bestätigter TRIM9-KO-Klone erfolgte mittels *immunoblotting*, der Quantifizierung des TRIM9-Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR sowie durch die Sequenzierung der CRISPR-Zielregion (siehe Abschnitte 2.2.1.4, 2.2.1.5, 2.2.2.3 und 2.2.2.4). Dabei wurden nur solche Zellklone weiter charakterisiert, die zuvor durch einen T7-Endonuklease-Verdau positiv auf stattgefundene Mutationen getestet wurden.

Durch Überlagerung der Sequenzen aller vorhandenen Allele eines Klons konnten im Rahmen der Sequenzierung nicht in jedem Fall die genauen Mutationen der Allele getrennt voneinander bestimmt werden, jedoch war eine Aussage über die Existenz noch verbliebener Wildtypallele möglich.

Bei der verwendeten CRISPR-Zielsequenz (5'→3': GCGGCTATGGCTCCTACGGGGGG, Basenposition 227-249 auf mRNA-Ebene im Exon 1 von TRIM9) führt ein durch Deletionen oder Inser-

tionen bedingter *frameshift* zu einem vorzeitigen Stop-codon (*frameshift +1* → Stop-codon Position 415-417, *frameshift +2* → Stop-codon Position 463-465, *frameshift -1* → Stop-codon Position 460-462, *frameshift -2* → Stop-codon Position 412-414). Von der 711 Aminosäuren umfassenden, langen TRIM9-Isoform bleiben demnach mutationsbedingt Restproteine einer maximalen Länge von 155 Aminosäuren übrig. Damit betrifft der Verlust von TRIM9 sowohl die kurze als auch die lange Isoform (siehe Abb. 1.2.2). Eine denkbare Restexpression stark verkürzter TRIM9-Residuen konnte durch den verwendeten polyklonalen Antikörper mittels *immunoblotting* nicht mehr nachgewiesen werden. Hinzu kommt die Degradation von Transkripten mutierter Gene, die für alle TRIM9-KO-Klone in Form eines reduzierten Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 3.2.1, 3.2.2 und 3.2.5).

3.2.1.1 Zelllinie 1205Lu

Auf Basis der Zelllinie 1205Lu konnten nach Durchlaufen einer Geneditierung mit einem auf die Basen 227-249 im Exon 1 von TRIM9 gerichteten CRISPR/Cas9-Konstrukt zwölf Einzelzellklone gewonnen werden, die sowohl im T7-Endonuklease-*screening* stattgefundene Mutationen anzeigten, als auch einen vollständigen Verlust der TRIM9-Banden im *immunoblot* aufwiesen. Für die weitere Charakterisierung wurden vier Klone (1/3/4/5) ausgewählt, deren Sequenzierungen eine genaue Bestimmung der Mutationen beider Allele unabhängig voneinander zuließen (siehe Abb. 3.2.3 und 3.2.4). Zusätzlich wurde ein fünfter TRIM9-defizienter Zellklon (Klon 2) charakterisiert, für den eine sichere Mutationsbenennung beider Allele nicht möglich war, der jedoch wie alle hier betrachteten 1205Lu-TRIM9-KO-Klone einen vollständigen Verlust der Wildtypsequenz aufwies (siehe Abb. 3.2.4).

Mittels *immunoblotting* konnten der vollständige Verlust beider TRIM9-Isoformen sowie mittels qRT-PCR eine deutliche Reduktion des TRIM9-Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene für alle fünf TRIM9-defizienten 1205Lu-Klone demonstriert werden (siehe Abb. 3.2.1 und 3.2.2).

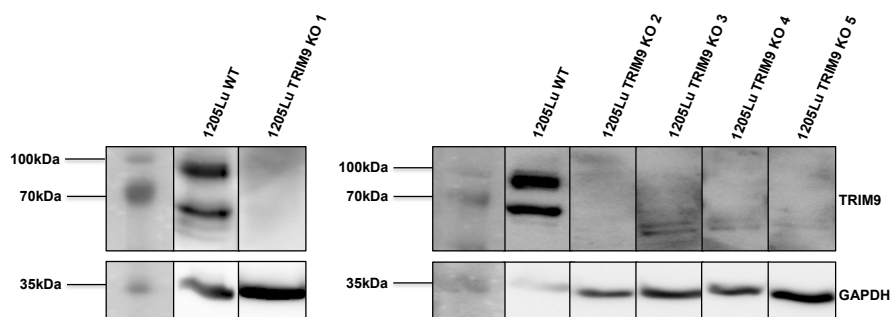


Abbildung 3.2.1: Zelllinie 1205Lu: Nachweis des *knock-outs* von TRIM9 auf Proteinebene. Nach der Lyse der angegebenen 1205Lu-Zellklone in RIPA-Puffer wurden 50 µg Protein in eine SDS-Gelelektrophorese und einen *western-blot* eingesetzt. Die Expression von TRIM9 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Fa. Proteintech) nachgewiesen und mit der Expression von GAPDH als Ladungskontrolle verglichen. Nebeneinander dargestellt sind Lysate von Zellklonen, die auf derselben PVDF-Membran geblottet wurden, jedoch nicht notwendigerweise nebeneinander aufgetragen worden waren.

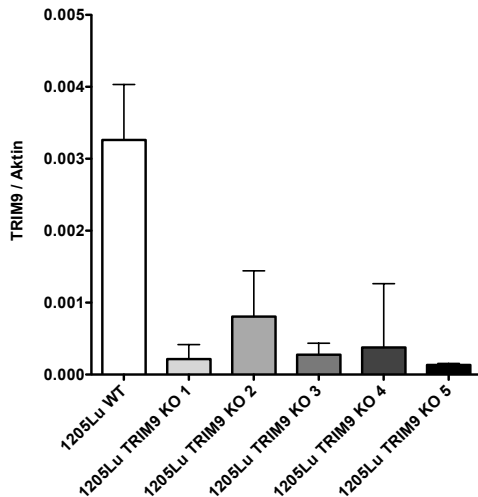


Abbildung 3.2.2: Die TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellklone weisen im Wildtypvergleich ein deutlich reduziertes TRIM9-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene auf. Nach Lyse der Zellklone erfolgte die RNA-Isolation und Quantifizierung der TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR relativ zu β -Aktin als *Housekeeping*-Gen. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt, die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (hier als methodischer Fehler) dargestellt; $n=1$.

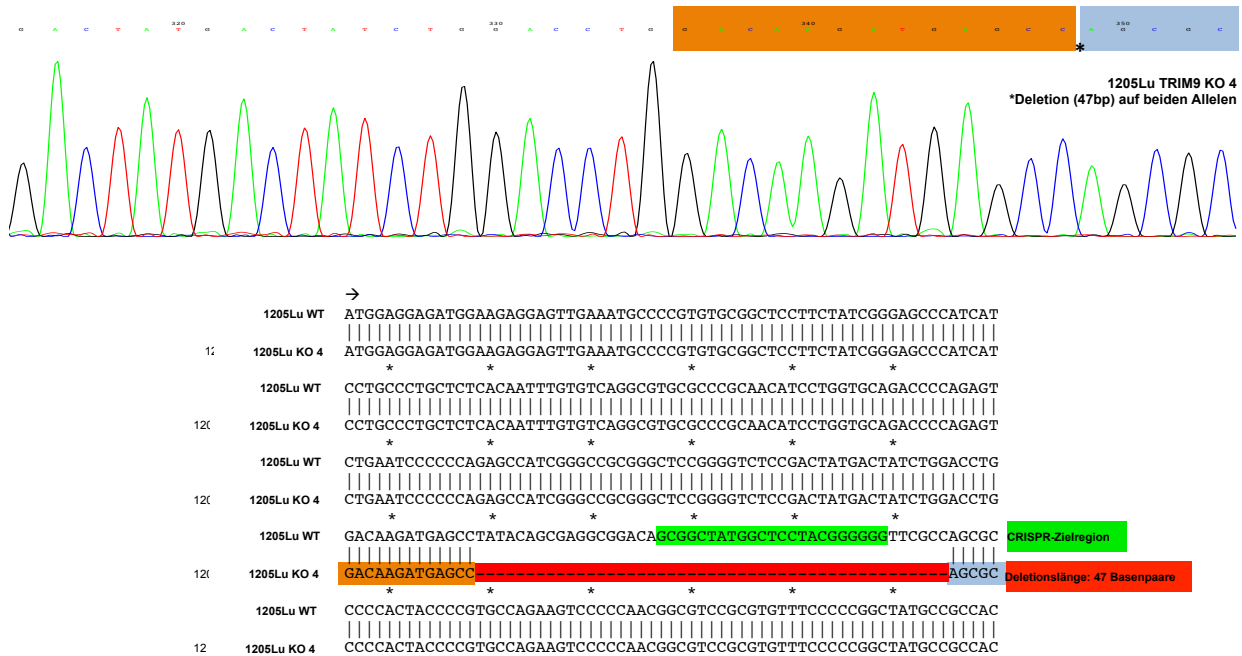


Abbildung 3.2.3: Der TRIM9-defiziente 1205Lu-Klon 4 zeigt in der Sequenzierung auf beiden Allelen dieselbe Deletion von 47 Basenpaaren. Nach Amplifikation der CRISPR-Zielregion mittels PCR und Aufreinigung des DNA-Fragmentes mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Sequenzierung nach Sanger durch eine externe Firma.

Bei Betrachtung der Sequenzen der jeweiligen CRISPR-Zielregionen zeigen die Klone verschiedene Mutationskombinationen. Es kann daher von fünf voneinander unabhängigen Zelllinien ausgegangen werden. Dabei führen bei drei Klonen (1/2/5) jeweils zwei unterschiedliche Mutationen (heterozygot) zu einer Leserasterverschiebung auf beiden Allelen (siehe Abb. 3.2.4). 1205Lu-TRIM9-KO-Klon 4 ist hingegen homozygot mutiert: Auf beiden Allelen ist es zu einer Deletion desselben DNA-Fragmentes von 47 Basenpaaren gekommen, wobei die Deletion sowohl die Aminosäureposition 76 als auch 80 (beides Serin, bekannte Phosphorylierungsstellen nach Shi et al. umfasst, siehe Abb. 3.2.3) [Shi et al., 2014]. 1205Lu-TRIM9-KO-Klon 3 zeigt ebenso eine Deletion derselben Base auf

beiden Allelen, wobei auf einem Allel jedoch zusätzlich noch eine Punktmutation (Basenposition 244 bedingt Gly→Arg) stattgefunden hat. Weiterhin weist 1205Lu-TRIM9-KO-Klon 2 durch das wiederholte Auftreten von Signalen drei unterschiedlicher Basen pro Sequenzposition Anzeichen einer Polyploidie auf. Dies ist bei den anderen 1205Lu-TRIM9-KO-Klonen nicht der Fall.

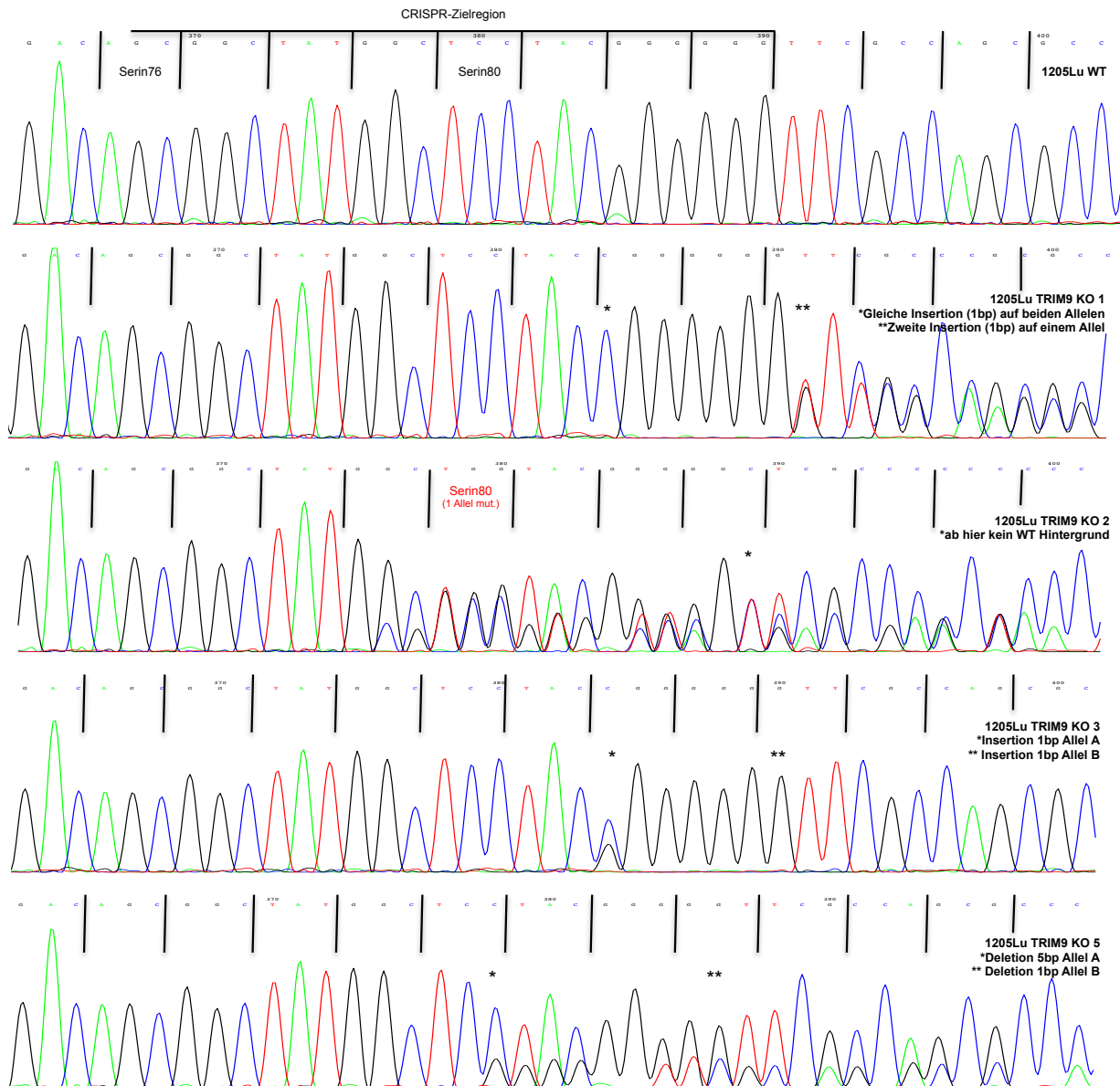


Abbildung 3.2.4: Die TRIM9-defizienten 1205Lu-Klone 1,2,3,5 weisen einen vollständigen Verlust der Wildtypsequenz auf. Nach Amplifikation der CRISPR-Zielregion mittels PCR und Aufreinigung des DNA-Fragmentes mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Sequenzierung nach Sanger durch eine externe Firma.

3.2.1.2 Zelllinie A549

Aus der Wildtypzelllinie A549 konnten nach Durchlaufen einer Geneditierung mit einem auf die Basen 227-249 im Exon 1 von TRIM9 gerichteten CRISPR/Cas9-Konstrukt zwei TRIM9-defiziente Klone etabliert werden, die nach positivem T7-Endonuklease-Mutations-*screening* sowohl den Verlust von TRIM9 im *western-blot* als auch ein deutlich reduziertes Expressionsniveau von TRIM9 auf mRNA-Ebene aufwiesen (siehe Abb. 3.2.5).

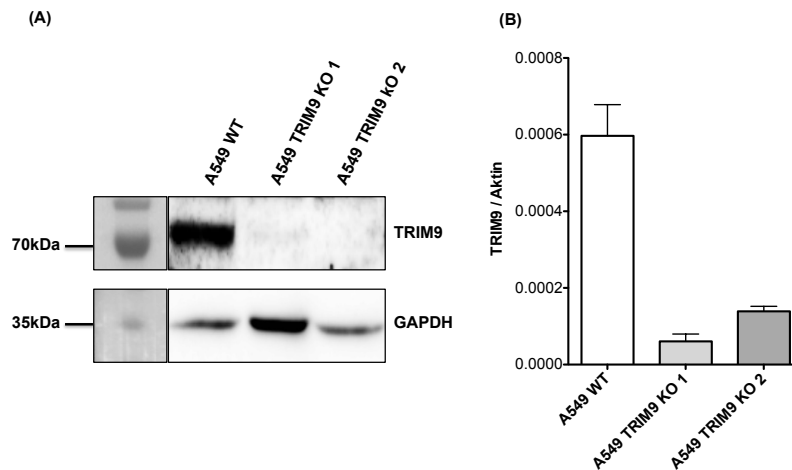


Abbildung 3.2.5: Zelllinie A549: Nachweis des *knock-outs* von TRIM9 auf Protein- und mRNA-Ebene. (A) Nach der Lyse der angegebenen A549-Zellklone in RIPA-Puffer wurden 50 µg Protein in eine SDS-Gelelektrophorese und einen *western-blot* eingesetzt. Die Expression von TRIM9 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Fa. Proteintech) nachgewiesen und mit der Expression von GAPDH als Ladungskontrolle verglichen. Dargestellt ist die Bande der langen Isoform von TRIM9. (B) Nach der Lyse der Zellklone erfolgte die RNA-Isolation und Quantifizierung der TRIM9-Expression relativ zu β -Aktin als *Housekeeping*-Gen auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Daten als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler); $n=1$.

Durch die Sequenzierung der CRISPR-Zielregionen konnte gezeigt werden, dass die beiden Klone verschiedene Mutationen aufweisen (siehe Abb. 3.2.6). Während die Sequenz des TRIM9-defizienten A549-Klons 1 durch das Auftreten drei unterschiedlicher Signale an einigen Sequenzpositionen Hinweise auf eine Polyploidie bei noch verbliebener Wildtypsequenz im Hintergrund aufweist, weist die Sequenz des TRIM9-defizienten A549-Klons 2 weder eine verbliebene Wildtypsequenz im Hintergrund noch Anzeichen einer Polyploidie auf. Zumindest für den A549-TRIM9-KO-Klon 2 kann damit von einem vollständigen Verlust von TRIM9 ausgegangen werden.

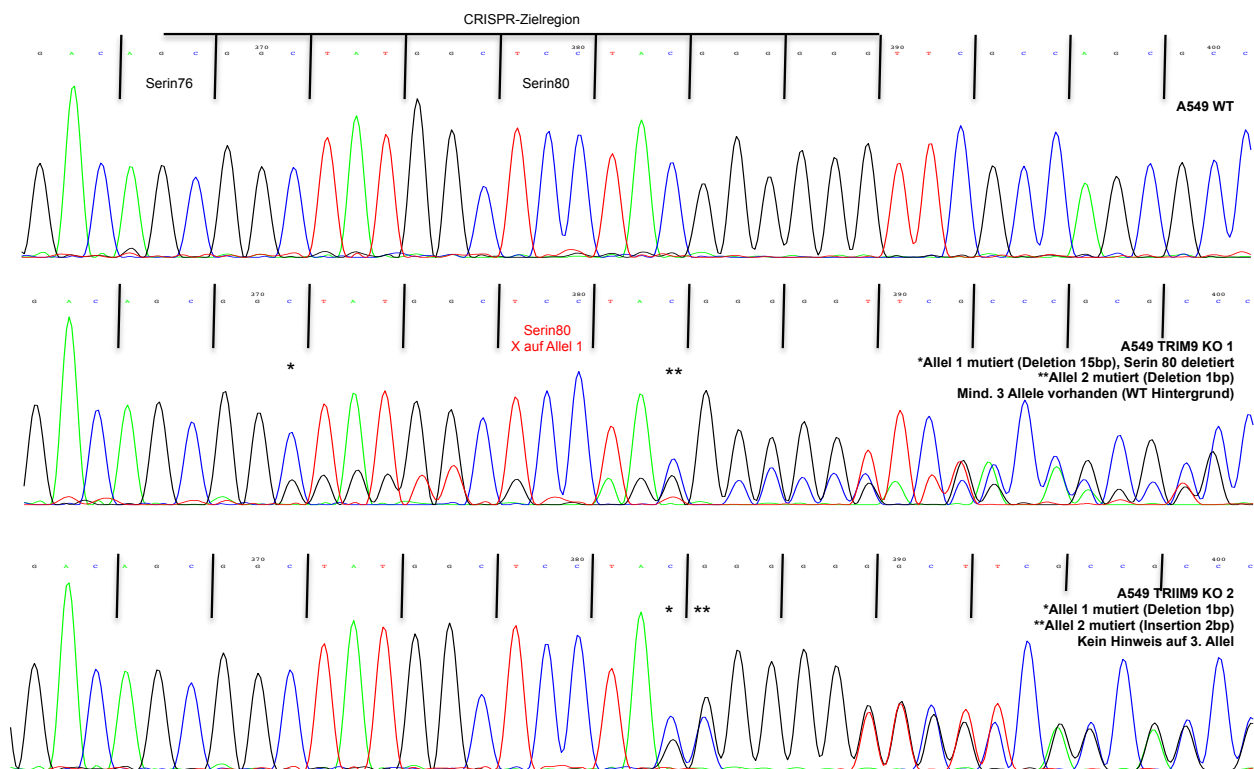


Abbildung 3.2.6: TRIM9-defiziente A549-Klone: Klon 2 weist einen vollständigen Verlust der Wildtypsequenz auf; Klon 1 weist noch verbliebene Wildtypsequenz bei Hinweisen auf eine Polyploidie auf. Nach Amplifikation der CRISPR-Zielregion mittels PCR und Aufreinigung des DNA-Fragmentes mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Sequenzierung nach Sanger durch eine externe Firma.

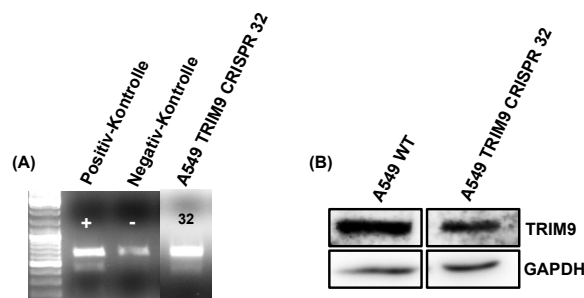


Abbildung 3.2.7: Die klonale Zelllinie A549-TRIM9-CRISPR-32 weist nach stattgehabter Geneditierung mittels CRISPR/Cas9 ein positives T7-Endonuclease-Mutations-screening bei noch detektierbarem TRIM9 im immunoblot auf und wird als zusätzliche Kontrolle in späteren Experimenten verwendet. (A): Nach Amplifikation der CRISPR-Zielregion mittels PCR und Aufreinigung des DNA-Fragmentes mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte der T7-Endonuclease-Verdau entsprechend dem in Abschnitt 2.2.2.3 erwähnten Protokoll. (B): Nach der Lyse der angegebenen A549-Zellklone in RIPA-Puffer wurden 50 µg Protein in eine SDS-Gelelektrophorese und einen *western-blot* eingesetzt. Die Expression von TRIM9 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Fa. Proteintech) nachgewiesen und mit der Expression von GAPDH als Ladungskontrolle verglichen. Dargestellt ist die Bande der langen Isoform von TRIM9.

3.2.1.3 Zelllinie Huh7.5

Aus der Wildtypzelllinie Huh7.5 konnte im Rahmen dieser Arbeit nach Durchlaufen einer Geneditierung mit einem auf die Basen 227-249 im Exon 1 von TRIM9 gerichteten CRISPR/Cas9-Konstrukt ein partieller *Knock-out*-Klon (pKO, TRIM9+/-) etabliert werden. Dieser weist eine mutationsbedingte Leserasterverschiebung eines Allels bei Verbleib des zweiten Wildtypallels auf. Mittels *immunoblotting* ist keine signifikante Reduktion des TRIM9-Expressionsniveaus nachweisbar, während sich in der qRT-PCR eine Reduktion der Expression von TRIM9 auf mRNA-Ebene zeigt (siehe Abb. 3.2.8).

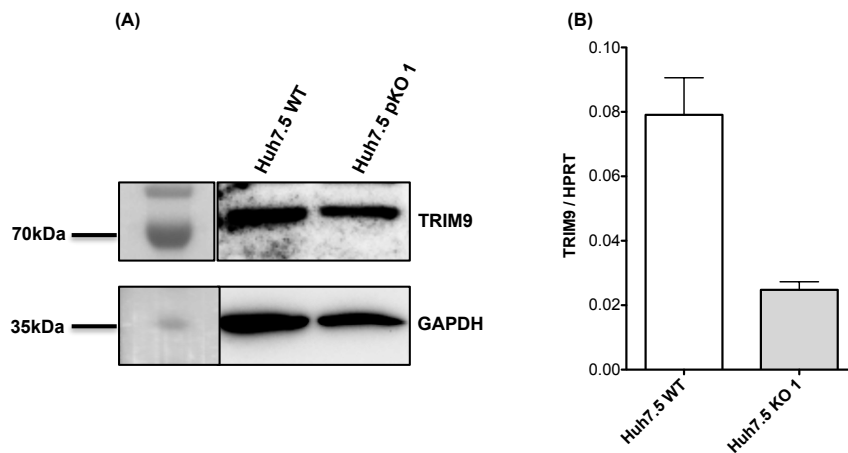


Abbildung 3.2.8: Zelllinie Huh7.5: Nachweis eines reduzierten TRIM9-Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene bei noch detektierbarer Proteinexpression für den Huh7.5-pKO-Klon 1 im Wildtypvergleich. (A) Nach der Lyse der angegebenen Huh7.5-Zellklone in RIPA-Puffer wurden 50 µg Protein in eine SDS-Gelelektrophorese und einen *western-blot* eingesetzt. Die Expression von TRIM9 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Fa. Proteintech) nachgewiesen und mit der Expression von GAPDH als Ladungskontrolle verglichen. Dargestellt ist die Bande der langen Isoform von TRIM9. (B) Nach der Lyse der Zellklone erfolgte die RNA-Isolation und Quantifizierung der TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR relativ zu HPRT als *Housekeeping*-Gen. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Daten als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler); n=1.

3.2.2 Retrovirale Transduktion: Etablierung stabil TRIM9-überexprimierender Zelllinien

Mittels retroviraler Transduktion wurden im Rahmen dieser Arbeit stabil die lange Isoform von TRIM9 überexprimierende Einzelzellklone auf Basis der Zelllinien HEK293, A549 und Huh7.5 etabliert. Nach Infektion der Wildtypzelllinien mit zuvor produzierten, retroviralen Partikeln erfolgte die Selektion in Puromycin-haltigem Medium über einen Zeitraum von 14 Tagen bis wieder annähernde Konfluenz im 6-*well*-Format erreicht wurde. Es folgte nach Grenzverdünnung das Ausplattieren von Einzelzellen in 96-*well*-Flachbodenplatten, sodass durch deren Heranwachsen klonale Zelllinien mit homogenem genetischen Hintergrund entstanden (siehe Abschnitt 2.2.1.3).

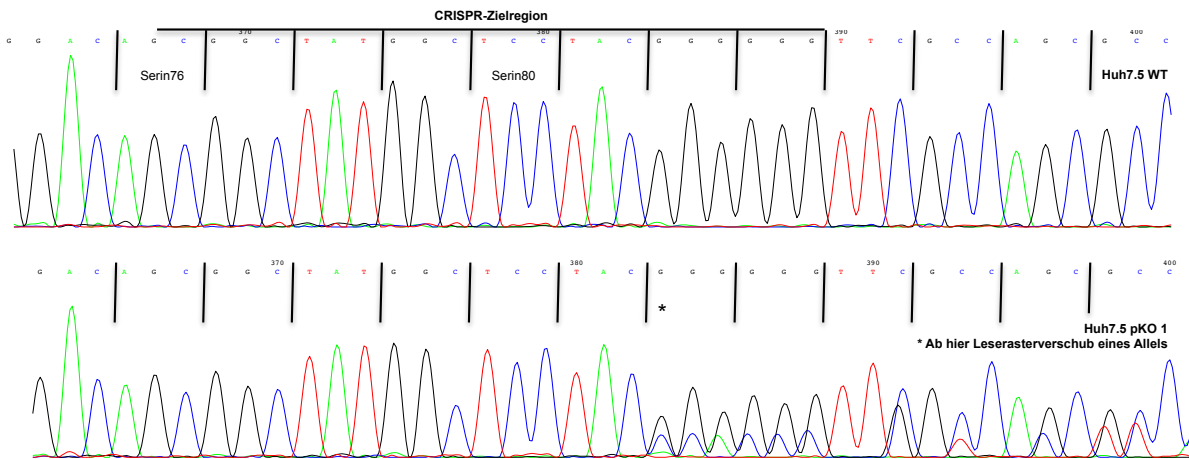


Abbildung 3.2.9: Nachweis einer Leserasterverschiebung auf einem Allel des Huh7.5-TRIM9-pKO-Klons 1 bei noch verbliebener Wildtypsequenz. Nach Amplifikation der CRISPR-Zielregion mittels PCR und Aufreinigung des DNA-Fragmentes mittels Agarose-Gelelektrophorese erfolgte die Sequenzierung nach Sanger durch eine externe Firma.

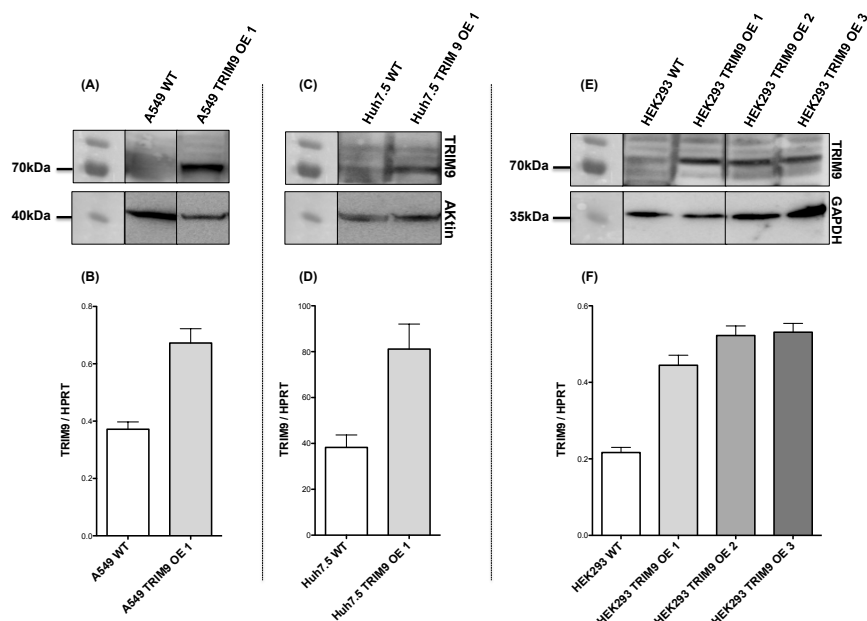


Abbildung 3.2.10: Die TRIM9-Überexpressionsklone der Zelllinien HEK293, A549 und Huh7.5 weisen im Wildtypvergleich sowohl eine intensivierete Bande im *immunoblot* als auch ein gesteigertes TRIM9-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene auf. (A/C/E): Nach der Lyse der angegebenen Zellklone in RIPA-Puffer wurden 50 µg Protein in eine SDS-Gelelektrophorese und einen *western-blot* eingesetzt. Die Expression von TRIM9 wurde mit einem polyklonalen Antikörper (Fa. Proteintech) nachgewiesen und mit der Expression von β -Aktin beziehungsweise GAPDH als Ladungskontrolle verglichen. Dargestellt ist die Bande der langen Isoform von TRIM9. (B/D/F): Nach der Lyse der in der Grafik angegebenen Zellklone erfolgte die RNA-Isolation und Quantifizierung der TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR relativ zu HPRT als *Housekeeping*-Gen. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Daten als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler); $n=1$.

Der Überexpressionsnachweis der heranwachsenden Einzelzellklone erfolgte auf Proteinebene mittels *immunoblotting* sowie durch die Quantifizierung des mRNA-Expressionsniveaus mittels qRT-PCR jeweils im Vergleich mit der korrespondierenden Wildtypzelllinie. Dabei zeigte insbesondere der *western-blot*, dass eine TRIM9-Überexpression in Folge der Insertion zusätzlicher TRIM9-Gene in das Genom der jeweiligen Zelllinie nicht durch eine intrinsische Instabilität von TRIM9, wie sie bei anderen E3-Ubiquitin-Ligasen durch Autoubiquitinierung vorkommt, kompensiert wird. Es konnten auf diese Weise drei Überexpressionsklone der Zelllinie HEK293, sowie jeweils ein Überexpressionsklon der Zelllinien A549 und Huh7.5 etabliert werden (siehe Abb. 3.2.10).

Interessanterweise stellte sich für alle etablierten Überexpressionsklone heraus, dass das TRIM9-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene maximal eine zweieinhalbfache Steigerung verglichen mit dem jeweils korrespondierenden Wildtyp aufwies. In Anbetracht des starken, konstitutiv aktiven Promotors, der das mittels retroviraler Transduktion zusätzlich in das Genom integrierte TRIM9-Gen kontrolliert, war dies nicht notwendigerweise erwartungsgemäß. Ein möglicher dosisabhängig zytotoxischer oder zytostatischer Effekt von TRIM9 ist vor diesem Hintergrund denkbar und wäre konsistent mit der Beobachtung, dass die transiente Überexpression von TRIM9 zu einem Arrest der Zellteilung führt¹ sowie konsistent mit der Beobachtung, dass die Mehrzahl der retroviral transduzierten Zellen verstarb.

3.2.3 STR-Analyse etablierter Einzelzellklone

Um die Zugehörigkeit etablierter Einzelzellklone zu korrespondierenden Wildtypzelllinien sowie die Zellidentität und Homogenität verwendeter Zelllinien zu bestätigen, wurde die Analyse des zelllinienspezifischen Längenmusters ihrer *short tandem repeats* (STR) auf bestimmten Genloki als Messmethode verwendet. So konnten durch den Vergleich mit den nach Datenbanklage zu erwartenden STR-Profilen Aussagen bezüglich Reinheit und Zelltypzugehörigkeit getroffen werden. Die STR-Analyse selbst wurde dabei von einem externen Institut auf Basis bereitgestellter DNA der verschiedenen Zellklone durchgeführt².

Es konnte hinsichtlich der verwendeten Wildtypzelllinien A549 und Huh7.5 sowie für alle daraus etablierten Einzelzellklone eine komplette Übereinstimmung mit den nach Datenbanklage erwarteten STR-Profilen festgestellt werden, sodass von Reinheit und korrekter Zelllinienzugehörigkeit der hier verwendeten Zellen ausgegangen werden kann.

Hinsichtlich der Zelllinie 1205Lu besteht eine Abweichung von dem erwarteten STR-Profil auf zwei Genloki (D16S539, VWA). Dabei besteht auf dem Genlokus VWA jedoch kein Unterschied zwischen der verwendeten Wildtypzelllinie und daraus etablierten Einzelzellklonen. Auch hinsichtlich des Genlokus D16S539 unterscheidet sich lediglich 1205Lu-TRIM9-KO-Klon 5 von der Wildtypzelllinie, während zwischen dieser und den anderen getesteten 1205Lu-TRIM9-KO-Klonen komplette Übereinstimmung besteht. Vor diesem Hintergrund wurden trotz geringfügiger Abweichungen des

¹Dieses Phänomen war auf Basis der Zelllinie A549 mittels konfokalmikroskopischem *live cell imaging* zu beobachten. Im Kontext einer möglichen Beteiligung von TRIM9 an der Zellzyklusregulation wurden die entsprechenden Aufnahmen sowie Experimente von Dr. Dharmendra Pandey durchgeführt, werden hier jedoch nicht weiter aufgeführt.

²Die STR-Analysen führte das Pathologische Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München durch.

STR-Profils Experimente mit den 1205Lu-TRIM9-KO-Klonen durchgeführt und durch die hier aufgeführte Wildtypzelllinie kontrolliert (siehe Tab. 1).

Zelllinie	Genlokus								
	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	VWA	TH01	AM	TPOX	CSF1PO
HEK293 WT	8/9	12/14	11/12	9/13	16/19	7/9.3	X/X	11	11/12
HEK293 WT	8/9	12/13/14	10/11/12	9/13	15/16/17/19	7/9.3	X	11	11/12/13
HEK293 WT (1)	8/9	12/14	10/11/-	9/13	15/-/19	7/9.3	X	10/11	11/12/13
HEK293 WT (2)	8/9	11/12/13/14	10/11/-	9/13	16/17/19	7/9.3	X	11	11/-/13
HEK293 KO 1	8/9	12/13/-/15	9.3/-/11/12	9/13	-/16/18/-/22	7/9.3	X	11	11/12/13
HEK293 KO 1 (1)	8/9	12/13/-/15	10.3/11/12	9/10/13	-/17/18/-/22	7/9.3	X	11	-/12/13
HEK293 KO 1 (2)	8/9	12/13/14/15	10.3/11/12	9/10/13	16/18/-/22	7/9.3	X	11	-/12/13
HEK293 KO 3	8/9	12/14/15	9.3/11/12	9/13	-/17/-/20	7/9.3	X	11	11/12
HEK293 KO 3 (1)	8/9	12/14/15	10/10.3/-/12	9/13	-/17/-/20	7/9.3	X	11	11/12
HEK293 KO 3 (2)	8/-/10	12/14/15	10/10.3/-/12	9/13	-/17/-/20	7/9.3	X	11	11/12
HEK293 OE 1	8/-	12/14	10/-/12	9/13	16/19	7/9.3	X	11	-/-/13
HEK293 OE 2	8/-	12/14	10/-/12	9/13	16/19	7/9.3	X	11	-/-/13
HEK293 OE 3	8/-	12/14	10/-/12	9/13	16/19	7/9.3	X	11	-/-/13
HEK293 WT*	8/9	12/14	11/-	9/13	16/19	7/9.3	X	11	7/-/12
1205Lu WT	10/12	8/14	10/12	11/12	16/17	6/8	X/Y	8/9	11/11
1205Lu WT	10/12	8/14	10/12	-/12	-/17	6/8	X/Y	8/9	11
1205Lu KO 1	10/12	8/14	10/12	-/12	-/17	6/8	X/Y	8/9	11
1205Lu KO 2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1205Lu KO 3	10/12	8/14	10/12	-/12	-/17	6/8	X/Y	8/9	11
1205Lu KO 4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1205Lu KO 5	10/12	8/14	10/12	-/12/13	-/17	6/8	X/Y	8/9	11
A549 WT	11/11	11/11	8/11	11/12	14/14	8/9.3	X/Y	8/11	10/12
A549 WT	11	11	8/11	11/12	14	8/9.3	X/Y	8/11	10/12
A549 KO 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
A549 KO 2	11	11	8/11	11/12	14	8/9.3	X/-	8/11	10/12
A549 OE 1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Huh7.5 WT	12/12	10/11	10/11	10/10	16/18	7/7	X/X	8/11	11/11
Huh7.5 WT	12	10/11	10/11	10	16/18	7	X	8/11	11
Huh7.5 pKO 1	12	10/11	10/11	10	16/18	7	X	8/11	11
Huh7.5 OE 1	12	10/11	10/11	10	16/18	7	X	8/11	11

Tabelle 1: Das Muster der Anzahl von *short tandem repeats* (STRs) auf verschiedenen Genloki gibt Auskunft über die Zugehörigkeit etablierter Einzelzellklone zu korrespondierenden Wildtypzelllinien. Blau dargestellt sind die nach Datenbanklage zu erwartenden STR-Profile der verschiedenen Zelllinien, in schwarz hervorgehoben sind die gemessenen STRs der verwendeten Wildtypzelllinien sowie darunter die STRs daraus etablierter Einzelzellklone. Rot dargestellt sind Abweichungen des jeweiligen STR-Profils von der Datenbanklage. Grünlich hinterlegt sind Zelllinien dargestellt, die zur weiteren Datenerhebung verwendet wurden. Die zelllinienspezifischen STR-Profile wurden für die Zelllinien HEK293 und A549 der Fa. ATCC (<http://www.lgcstandards-atcc.org>), für die Zelllinie 1205Lu des „WISTAR Institutes“ (<http://www.wistar.org/lab/meenhardherlyn-dvm-dsc/page/melanoma-cell-str-profiles>) sowie für die Zelllinie Huh7.5 der Fa. Mission Biotech (http://www.genelabs.com.tw/Upload/FileDown_20135131250253454.pdf) entnommen. ND: STR-Analyse für diesen Zellklon nicht durchgeführt.

HEK293*: Frisch bestellte HEK293-Zelllinie

HEK293 WT(1): Einzelzellklon 1 nach Subklonierung von HEK293 WT

HEK293 WT(2): Einzelzellklon 2 nach Subklonierung von HEK293 WT

HEK293 KO 1(1): Einzelzellklon 1 nach Subklonierung von HEK293 KO 1

HEK293 KO 1(2): Einzelzellklon 2 nach Subklonierung von HEK293 KO 1

HEK293 KO 3(1): Einzelzellklon 1 nach Subklonierung von HEK293 KO 3

HEK293 KO 3(2): Einzelzellklon 2 nach Subklonierung von HEK293 KO 3

Hinsichtlich der Zelllinie HEK293 sowie der daraus etablierten Einzelzellklone zeigten sich starke Abweichungen des STR-Profiles vom erwarteten Datenbankprofil auf verschiedenen Genloki. Dabei war sowohl ein Wegfall erwarteter STR-Signale als auch ein zusätzliches Auftreten unerwarteter STR-Signale zu beobachten. Um auf eine Kontamination als mögliche Ursache zu prüfen, wurden die HEK293-Wildtypzelllinie und die Einzelzellklone HEK293-TRIM9-KO-Klon 1 sowie HEK293-TRIM9-KO-Klon 3 nochmals einzelzellklontiert. Das resultierende STR-Profil näherte sich durch erneute Einzelzellklonierung jedoch nicht wesentlich der zu erwartenden Datenbanklage an (siehe Tab. 1). Letztlich blieb die Frage nach dem Grund für abweichende STR-Profile offen; möglicherweise ist dies auf zahlreiche Zellpassagen und eine lang andauernde Kultivierung im Labor zurückzuführen.

Aufgrund der Abweichungen der STR-Profile finden Daten auf Grundlage der etablierten TRIM9-defizienten sowie TRIM9-überexprimierenden HEK293-Klone im Folgenden keine Berücksichtigung. Alle Zelllinien, auf Basis derer im Rahmen dieser Arbeit Daten erhoben wurden, sind in Tabelle 1 grau hinterlegt dargestellt.

3.3 Der Einfluss der TRIM9-Expression auf ssRNA-Virus-Infektionen *in vitro*

Abschnittsüberblick	Seite
3.3.1 Infektionen mit (-)ssRNA-Viren	63
3.3.1.1 Virusreplikation und Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen	63
3.3.1.2 Eine transiente TRIM9-Überexpression inhibiert die Replikation des <i>Vesicular-stomatitis</i> -Virus (VSV)	70
3.3.1.3 Keine Kolokalisation von TRIM9 und VSV	73
3.3.2 Infektionen mit (+)ssRNA-Viren	74
3.3.2.1 Virusreplikation und Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen	75
3.3.2.2 Stimulation mit RNA-Isolaten HCV-infizierter Zellen	79

In diesem Abschnitt soll der Einfluss der TRIM9-Expression auf die virusinduzierte Immunantwort sowie auf die Virusreplikation untersucht werden. Dabei wurden Daten in erster Linie auf Basis der Zelllinie 1205Lu (Wildtyp sowie TRIM9-KO-Klone 1/3/5) erhoben, deren Reproduzierbarkeit stichprobenartig in den Zelllinien Huh7.5 (WT sowie TRIM9-pKO-Klon 1) und A549 (WT sowie TRIM9-KO-Klone 1/2 und TRIM9-OE-Klon 1) bestätigt werden konnte. Der Einfluss des TRIM9-Expressionsniveaus wurde sowohl für Infektionen mit ssRNA-Viren negativer Polarität (*Vesicular-stomatitis*-Virus, Sendai-Virus) als auch für Infektionen mit ssRNA-Viren positiver Polarität (Gelbfieber-Impf-Virus, Enzephalomyokarditis-Virus, *Semliki-forest*-Virus, Hepatitis-C-Virus) charakterisiert.

3.3.1 Infektionen mit (-)ssRNA-Viren

3.3.1.1 Virusreplikation und Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen

Es zeigten sich im Rahmen der Infektion mit VSV und VSV-M51R (*Vesicular-stomatitis*-Virus, die M51R-Mutation des viralen Matrixproteins ermöglicht eine unbeeinträchtigte Genexpression und Immunantwort der Wirtszellen, [Kim and Kang, 2007]) signifikante Einflüsse der TRIM9-Expression auf die virusinduzierte Immunantwort wie auch auf die Virusreplikation.

Es konnten zunächst vom TRIM9-Expressionsniveau deutlich affizierte virale Replikationsraten in 1205Lu-Zellen gemessen werden: So zeigte sich 24 Stunden nach der Infektion mit VSV sowie VSV-M51R im Überstand TRIM9-defizienter Zellen eine signifikant reduzierte Virionenlast im

Vergleich zum Überstand von Wildtypzellen (siehe Abb. 3.3.1, A/B). Weiterhin konnte auch intrazellulär eine deutliche Inhibition der Virusreplikation durch Quantifizierung viraler RNA (virales N-Protein) mittels qRT-PCR gemessen werden. Dabei zeigte sich dieser Effekt sowohl im Rahmen einer Quantifizierung relativ zum zelleigenen β -Aktin als auch relativ zu artifiziell der cDNA hinzugefügter eGFP-cDNA als indirekte Methode einer absoluten Quantifizierung (siehe Abb. 3.3.1, C/D). Vor dem Hintergrund eines reproduzierbaren Phänotypes, den drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone im Wildtypvergleich aufweisen, liegt ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau von TRIM9 und der Replikation von VSV unter Vernachlässigung von Nebeneffekten der Einzelzellklonierung nahe.

Hinsichtlich der VSV-induzierten Immunantwort war erwartungsgemäß nur im Rahmen der Infektion mit VSV-M51R eine deutliche Sekretion von IP-10 und Interleukin-6 (IL-6) in den Zellüberstand nachweisbar. TNF- α war in diesem Zusammenhang nicht detektierbar. Es zeigte sich in TRIM9-defizienten Zellen eine im Vergleich zu Wildtypzellen deutlich verminderte Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Infektion mit VSV-M51R. Die ausbleibende Sekretion von IL-6 durch den 1205Lu-TRIM9-KO-Klon 3 wird hier als Nebeneffekt der Einzelzellklonierung interpretiert (siehe Abb. 3.3.2). Auch die mittels qRT-PCR quantifizierte Hochregulation verschiedener im Rahmen der antiviralen Immunantwort induzierten Gene (hier: Interferon- β , RIG-I, MDA5, IP-10, ISG-15, ISG-54, IL-8, IL-1 β , TNF- α) zeigte eine generalisiert verminderte Immunantwort TRIM9-defizienter Zellen im Wildtypvergleich nach Infektion mit VSV-M51R (siehe Abb. 3.3.4).

Neben der VSV-induzierten Immunantwort wurde weiterhin die Sendai-Virus-induzierte (Sendai-Virus, SeV) Sekretion von IP-10 charakterisiert. Dabei zeigte sich hinsichtlich der Sekretion von IP-10 derselbe, jedoch weniger ausgeprägte Phänotyp wie bereits für die Infektion mit VSV beschrieben: TRIM9-defiziente Zellen wiesen im Wildtypvergleich eine reduzierte Sekretion von IP-10 auf (siehe Abb. 3.3.3).

Um weiterhin zu demonstrieren, dass die TRIM9-Expression die Replikation von VSV nicht nur in der Zelllinie 1205Lu affektiert, wurde die Replikation eines GFP-exprimierenden VSV-Stammes (das virale Phosphoprotein ist bei dieser Mutante mit GFP fusioniert) innerhalb der Zelllinien A549 sowie Huh7.5 in Abhängigkeit von der TRIM9-Expression durchflusszytometrisch quantifiziert. Dabei ermöglicht die Fluoreszenzmarkierung die durchflusszytometrische Quantifizierung des Anteils infizierter Zellen. Auf diese Weise zeigte sich auch in der Zelllinie A549 der Effekt einer durch die TRIM9-Defizienz signifikant inhibierten Virusreplikation. Die zusätzlich miteinbezogene Wildtypkontrolle (A549-TRIM9-CRISPR-Klon 32 ist ein mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung behandelter Einzelzellklon, der durch ein positives T7-Endonuklease-Mutations-*screening* bei noch mittels *immunoblotting* detektierbarem TRIM9 auffällt, siehe Abb. 3.2.7) zeigt dabei keinen Unterschied zum Wildtyp, während der stabil TRIM9-überexprimierende Klon zwar keinen signifikanten Effekt, aber zumindest eine der TRIM9-Defizienz entgegengesetzte Tendenz aufweist (siehe Abb. 3.3.5, D). Auch hinsichtlich der Sekretion von IP-10 ist - wenn auch limitiert durch das geringe immunstimulatorische Potential des WT-Matrixprotein enthaltenden Virusstammes - ein ähnlicher Effekt wie in der 1205Lu-Zelllinie zu messen: Die TRIM9-Defizienz bedingt im Wildtypvergleich nicht nur eine supprimierte Virusreplikation, sondern ebenso eine verminderte virusinduzierte Sekretion von

IP-10 (siehe Abb. 3.3.5, E).

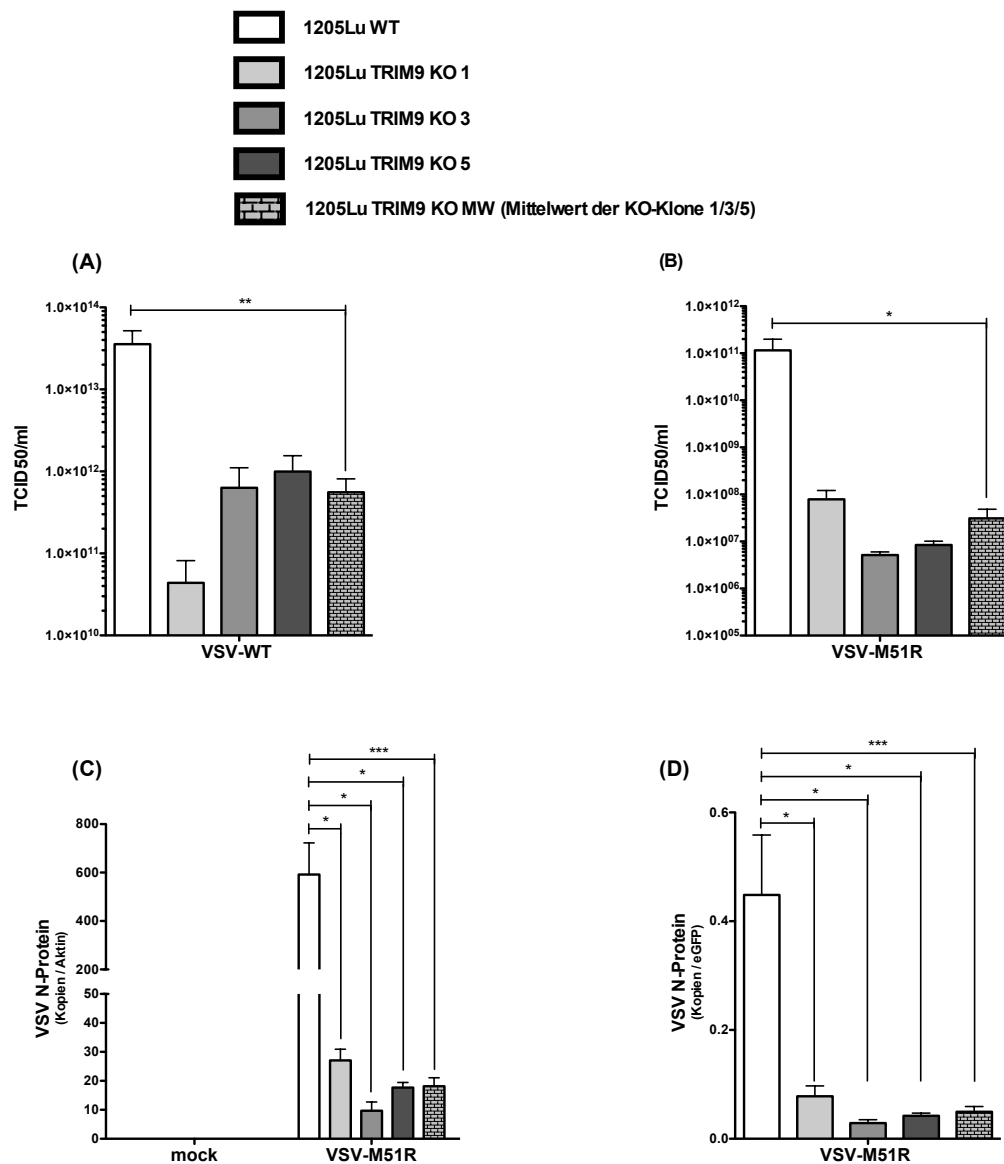


Abbildung 3.3.1: VSV repliziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen weniger als in 1205Lu-WT-Zellen. Drei verschiedene TRIM9-defiziente 1205Lu-Zellklone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro *well* auf einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit VSV-WT (A) oder der VSV-M51R-Mutante (B-D) (jeweils MoI 0.1). 24 Stunden nach der Infektion wurden die Virustiter in den Kulturüberständen mittels TCID50-*assays* bestimmt (A/B) und nach RNA-Isolation aus den Zellpellets wurde die Expression des viralen N-Proteins mittels qRT-PCR bestimmt (C/D). Die Expression des viralen N-Proteins wurde dabei entweder relativ zum *Housekeeping*-Gen β -Aktin bestimmt (C) oder relativ zu einer zur Quantifizierung zugegebenen eGFP-DNA bestimmt (D). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus drei ($n=3$) unabhängigen Experimenten für jeden der Klone einzeln angegeben. Zusätzlich ist der Mittelwert aus allen drei Klonen (1205Lu TRIM9 KO MW) angegeben bei $n=9$ (3×3). Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für die markierten Vergleiche bestimmt und sind angegeben als $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

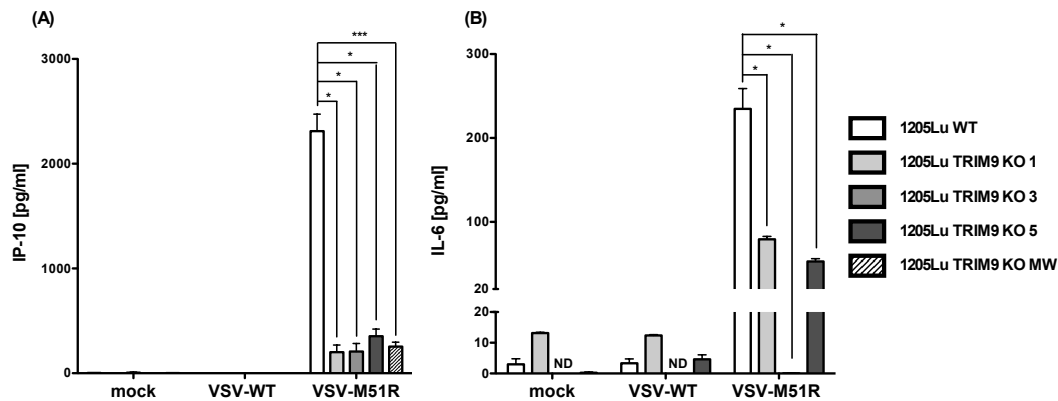


Abbildung 3.3.2: Die Infektion mit VSV induziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen eine geringere Sekretion von IP-10 und IL-6 als in 1205Lu-WT-Zellen. Drei verschiedene TRIM9-defiziente 1205Lu-Zellklone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro *well* auf einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit VSV oder der VSV-M51R-Mutante (jeweils MoI 0.1). 24 Stunden nach der Infektion wurden die Konzentrationen von IP-10 und IL-6 in den Zellüberständen mittels ELISA quantifiziert (ND = unterhalb der Nachweisgrenze). Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus drei ($n=3$) unabhängigen Experimenten für jeden der Klone einzeln angegeben. Zusätzlich ist der Mittelwert aus allen drei Klonen (1205Lu TRIM9 KO MW) angegeben bei $n=9$ (3×3). Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für die markierten Vergleiche bestimmt und sind angegeben als $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

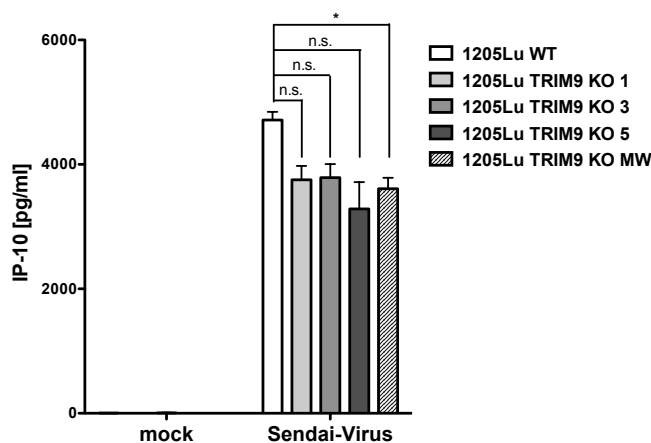


Abbildung 3.3.3: Die Infektion mit Sendai-Virus induziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen eine geringere Sekretion von IP-10 als in 1205Lu-WT-Zellen. Drei verschiedene TRIM9-defiziente 1205Lu-Zellklone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro *well* auf einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit dem Sendai-Virus (20 U/ml). 24 Stunden nach der Infektion wurden die Konzentrationen von IP-10 in den Zellüberständen mittels ELISA quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus drei ($n=3$) unabhängigen Experimenten für jeden der Klone einzeln angegeben. Zusätzlich ist der Mittelwert aus allen drei Klonen (1205Lu TRIM9 KO MW) angegeben bei $n=9$ (3×3). Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für die markierten Vergleiche bestimmt und sind angegeben als $*=p<0.05$, n.s.=nicht signifikant.

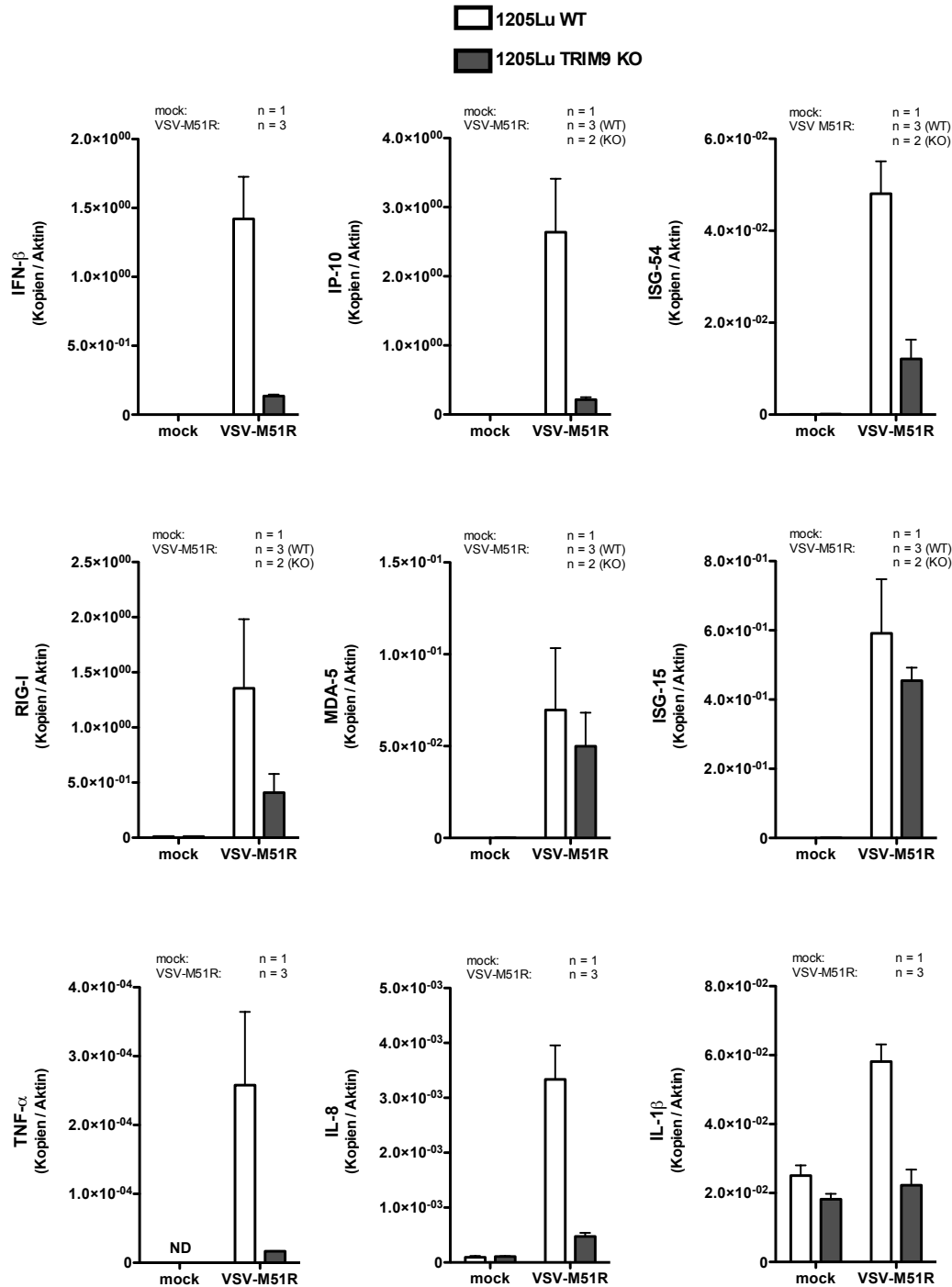


Abbildung 3.3.4: Die Expression Interferon-induzierter Gene (ISGs) und inflammatorischer Zytokine wird in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen nach Infektion mit VSV-M51R in geringerem Maße induziert als in 1205Lu-WT-Zellen. Ein Zellgemisch aus äquivalenten Anteilen der 1205Lu-TRIM9-KO-Klone 1/3/5 einerseits sowie 1205Lu-WT-Zellen andererseits wurden mit 100.000 Zellen pro *well* auf einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit VSV-M51R (MoI 0.1). Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die RNA-Isolation aus den Zellpellets und die Expression der in der Grafik angegebenen Gene wurde mittels qRT-PCR relativ zu β -Aktin als *Housekeeping*-Gen bestimmt. Die Anzahl der unabhängig durchgeführten Wiederholungen des Experimentes entspricht den Angaben (n) in den jeweiligen Subfiguren. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt; bei n=1 ist der SEM als methodischer Fehler auf Basis der in Triplikaten durchgeführten qRT-PCR dargestellt, bei n>1 ist der SEM als biologischer Fehler auf Basis der Mittelwerte unabhängig durchgeführter Wiederholungen dargestellt.

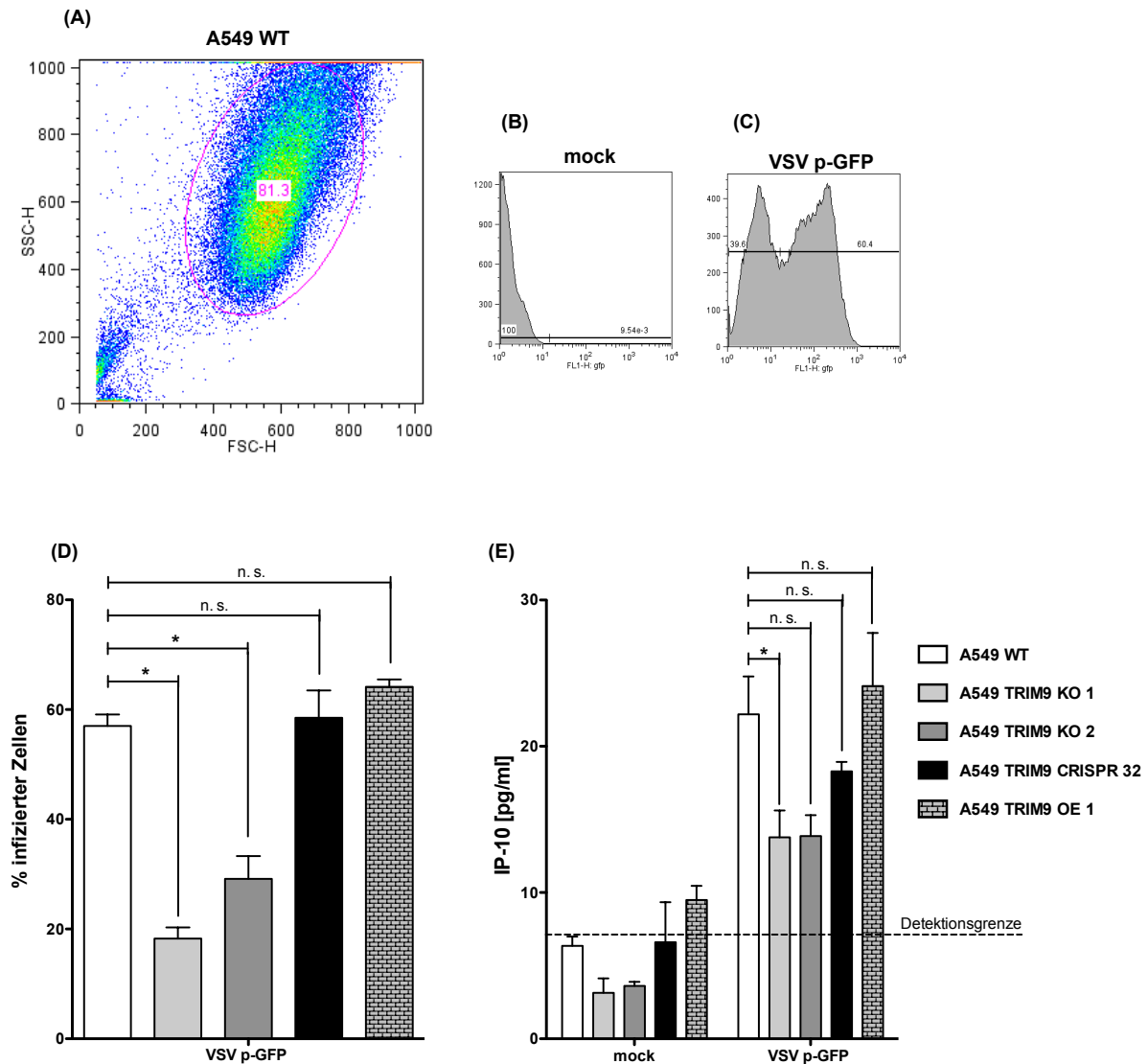


Abbildung 3.3.5: Die VSV-Replikation und dadurch bedingte Induktion von IP-10 findet in TRIM9-defizienten A549-Zellen weniger und in TRIM9-überexprimierenden A549-Zellen mehr statt als in A549-WT-Zellen. Zwei verschiedene A549-TRIM9-KO-Klone, ein TRIM9-überexprimierender A549-Klon, A549-WT-Zellen sowie als zusätzliche Kontrolle die klonale Zelllinie A549-TRIM9-CRISPR-32 (siehe Abschnitt 3.2.1.2 und Abb. 3.2.7) wurden mit je 100.000 Zellen pro *well* in 6-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit VSV-p-GFP (MoI 1). 18 Stunden nach der Infektion wurden die Konzentrationen von IP-10 in den Zellüberständen mittels eines in Triplikaten durchgeführten ELISA gemessen (E). 18 Stunden nach der Infektion wurden darüber hinaus die Zellen abtrypsiniert, in vierprozentiger PFA-Lösung fixiert, verbliebene Viren wurden mittels hochenergetischem UV-Licht inaktiviert und die Zellsuspension wurde zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet: In (A) ist dabei die Zellpopulation im FSC-SSC-Diagramm dargestellt, in (B/C) ist das durch die Virusinfektion aufkommende GFP-Signal illustriert. In (A-C) ist dabei ein repräsentatives Experiment aus insgesamt drei unabhängigen Wiederholungen illustriert. In (D) ist der prozentuale Anteil infizierter Zellen der jeweiligen Zelllinien dargestellt. In (D/E) sind Daten als Mittelwerte +SEM auf Basis drei unabhängiger Experimentwiederholungen dargestellt; $n=3$. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für die markierten Vergleiche bestimmt und sind angegeben als $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, n.s.=nicht signifikant.

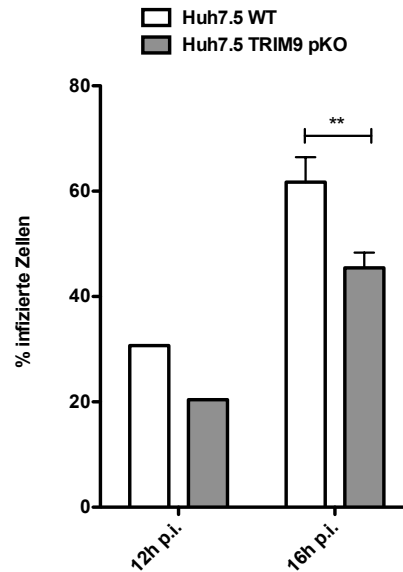


Abbildung 3.3.6: Der partielle *knock-out* nur eines Allels von TRIM9 ist mit einer verminderten Replikationsrate von VSV in der Zelllinie Huh7.5 assoziiert. Die Zelllinien Huh7.5-Wildtyp sowie Huh7.5-TRIM9-pKO wurden mit je 900.000 Zellen pro *well* auf 6-*well*-Flachbodenplatten ausplatziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit VSV-p-GFP (800.000 PFUs pro *well*). Zwölf sowie 16 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen abtrypsiniert, in vierprozentiger PFA-Lösung fixiert, verbliebene Viren wurden mittels hochenergetischem UV-Licht inaktiviert und die Zellsuspension wurde zur durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich des prozentualen Anteils infizierter, GFP-positiver Zellen verwendet. Das Experiment wurde hinsichtlich der Auswertung zwölf Stunden nach Infektion einmalig durchgeführt. Hinsichtlich der Auswertung 16 Stunden nach Infektion wurde das Experiment zu vier unabhängigen Zeitpunkten wiederholt (12h p.i.: $n=1$, 16h p.i.: $n=4$); die Daten sind hier dargestellt als Mittelwerte +SEM. Die Signifikanz wurde für den Zeitpunkt 16h p.i. mit dem Student t-Test für den markierten Vergleich bestimmt und ist angegeben als $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$.

Der Effekt einer durch den partiellen Verlust von TRIM9 supprimierten Virusreplikation konnte ebenso für die Zelllinie Huh7.5 durchflusszytometrisch demonstriert werden (siehe Abb. 3.3.6).

In den VSV-Infektions-*assays* geht damit in TRIM9-defizienten Zellen eine im Wildtypvergleich signifikant reduzierte Immunantwort mit einer signifikanten Inhibition der viralen Replikation einher. In diesem Zusammenhang liegt die Vermutung nahe, dass eine primär inhibierte Virusreplikation zu einer im Zeitverlauf verminderten Viruslast führt, die aufgrund einer verminderten Stimulationsintensität involvierter Mustererkennungsrezeptoren eine verminderte Immunantwort bedingt. In diesem Fall wäre der TRIM9-abhängige Unterschied der VSV-induzierten Immunantwort durch eine Inhibition der viralen Replikation verursacht. In der Tat induzierte die Transfektion von RNA-Isolaten VSV-infizierter Zellen (VSV kann sich in Ermangelung der eigenen Polymerase allein auf Basis der negativ polarisierten viralen RNA nicht replizieren) eine Sekretion von IP-10, die von der An- oder Abwesenheit von TRIM9 nicht beeinflusst wurde (siehe Abb. 3.3.7).

Damit konnte zusammenfassend auf Basis der Zelllinie 1205Lu - unter Demonstration einer stichprobenartigen Reproduzierbarkeit in den Zelllinien A549 sowie Huh7.5 - gezeigt werden, dass das *Vesicular-stomatitis*-Virus von der Anwesenheit von TRIM9 hinsichtlich seiner eigenen Replikation profitiert und die TRIM9-Defizienz entsprechend zu einer Inhibition der Virusreplikation führt. Weiterhin wurde im Rahmen einer VSV-Infektion demonstriert, dass der Verlust von TRIM9 eben-

so zu einer verminderten Sekretion von IP-10 und IL-6 sowie zu einer verminderten Induktion zahlreicher ISGs führt. Dabei ist die verminderte Immunantwort im Falle von VSV mutmaßlich auf eine primär affizierte Virusreplikation zurückzuführen. Für diese Interpretation spricht auch, dass sich das immunstimulatorische Potenzial isolierter VSV-RNA als unbeeinflusst vom TRIM9-Expressionsniveau darstellte (siehe Abb. 3.3.7).

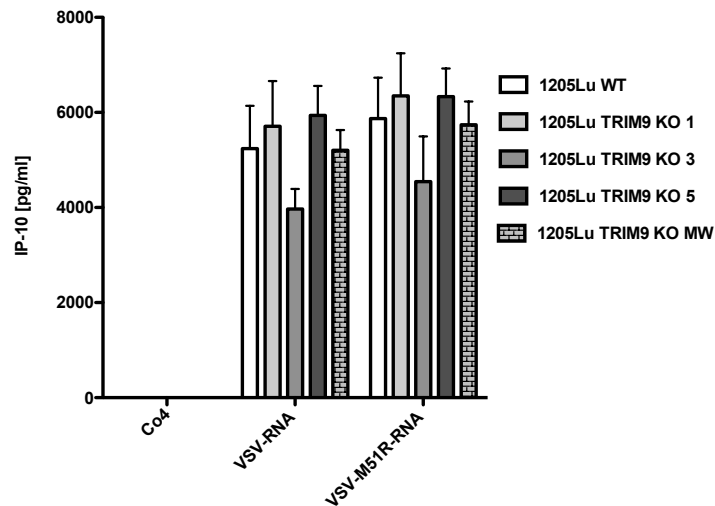


Abbildung 3.3.7: Das immunstimulatorische Potential der isolierten genomischen RNA von VSV ist nicht von der TRIM9-Expression beeinflusst. Es wurden 100.000 1205Lu-Zellen pro *well* in einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert und am nächsten Tag mit VSV oder VSV-M51R infiziert (jeweils MoI 0.1). Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Gesamt-RNA der virusinfizierten Zellen isoliert. Im dargestellten Experiment wurden drei verschiedene TRIM9-defiziente 1205Lu-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen mit jeweils 100.000 Zellen pro *well* im 24-*well*-Format ausplattiert und mit 500 ng/ml dieser VSV-RNA-enthaltenden, immunstimulatorischen RNA oder mit einer nicht stimulierenden Kontroll-RNA (Co4) transfiziert. Nach 18 Stunden wurden in den Kulturüberständen die Konzentrationen von IP-10 mittels ELISA quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus drei unabhängigen Experimenten für jede der Zelllinien einzeln angegeben; **einzeln n=3**. Zusätzlich ist der Mittelwert aus allen drei TRIM9-defizienten Klonen angegeben; **KO MW n=9 (3x3)**.

3.3.1.2 Eine transiente TRIM9-Überexpression inhibiert die Replikation des *Vesicular-stomatitis*-Virus (VSV)

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit der Effekt einer transienten Überexpression der langen Isoform von TRIM9 (TRIM9l) mit dem Effekt einer stabilen Überexpression von TRIM9l konsistent und dem Effekt des gemeinsamen *knock-outs* beider TRIM9-Isoformen entgegengerichtet ist.

Es zeigte sich auf Basis der Zelllinie A549, dass eine der VSV-Infektion vorausgehende, transiente Überexpression von mittels mCherry fluoreszenzmarkiertem TRIM9l trotz der hier geringen Transfektionseffizienz von circa 10 Prozent (siehe Abb. 3.3.8, A6) die Virusreplikation im Vergleich zur Negativkontrolle (Transfektion eines ausschließlich für mCherry kodierenden Plasmids) inhibiert. Dabei war die Virusreplikation sowohl in der Subpopulation der transfizierten als auch innerhalb der nicht transfizierten Zellen inhibiert (siehe Abb. 3.3.8, B/C). Dass bereits die geringen Transfektionseffizienzen für diesen Effekt ausreichend waren, zeigt hierbei die Positivkontrolle: Die Transfektion von fluoreszenzmarkiertem MAVS in ebenfalls nur knapp 10 Prozent der Zellen (siehe Abb. 3.3.8, A5) war für eine nahezu vollständige Inhibition der Virusreplikation ausreichend.

Hinsichtlich der Sekretion von IP-10 war eine geringfügig gesteigerte Zytokinsekretion im Rahmen der Überexpression von TRIM9 sowie eine deutlich gesteigerte Sekretion von IP-10 im Rahmen der Überexpression von MAVS nachweisbar (siehe Abb. 3.3.8, D). Dass die Virusreplikation trotz der geringen Transfektionseffizienzen auch in der Subpopulation der nicht transfizierten Zellen inhibiert war, kann als Hinweis gewertet werden, dass es sich bei der Replikationssuppression nicht um einen zellintrinsischen Effekt der transfizierten Zellen handelt. Wahrscheinlicher wäre hier die Interpretation, dass eine durch die Überexpression von TRIM9 sowie MAVS bedingte immunogene Wirkung und Zytokinsekretion die Resistenz der ganzen Zellkultur gegenüber einer Virusinfektion erhöht. Dabei kommt hinsichtlich der Überexpression von MAVS eine Aktivierung des von MAVS ausgehenden RLR-*signalings* mit Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, IRF7 sowie NF- κ B (siehe Abb. 1.1.2) als Ursache der erhöhten IP-10-Sekretion in Betracht. Hinsichtlich der Überexpression von TRIM9 ist neben einer direkten zytokininduzierenden Wirkung von TRIM9 ebenso eine artifizielle immunogene Wirkung in Betracht zu ziehen, die durch die präinfektiöse Einbringung von Fremd-DNA in Form des Expressionsplasmids zustande kommt und dadurch zu einer geringfügig erhöhten Sekretion von IP-10 führt. Ein solcher Effekt wäre in Anbetracht desselben Vektorrückgrats jedoch auch im Rahmen der Kontrolle (Transfektion eines für mCherry kodierenden Expressionsplasmids) zu erwarten.

Letztlich konnte gezeigt werden, dass der Effekt einer transienten Überexpression von TRIM9 hinsichtlich einer affizierten Replikation von VSV nicht mit dem Effekt eines stabil veränderten TRIM9-Expressionsniveaus konsistent ist. Während sich im Rahmen einer stabil veränderten TRIM9-Expression ein fördernder Einfluss von TRIM9 auf die Replikation von VSV darstellte (siehe Abb. 3.3.5), zeigte die transiente Überexpression von TRIM9 einen inhibitorischen Einfluss auf die Virusreplikation (siehe Abb. 3.3.8). Einerseits ist hier als Erklärung eine mögliche immunogene Wirkung zu diskutieren, die bereits durch die Transfektion eines Expressionsplasmids zustande kommt. Diese Erklärung wird durch die Erfahrung der Arbeitsgruppe untermauert, dass bereits die Transfektion des Leervektors pcDNA5 zu einer geringfügigen Interferoninduktion führt (hier nicht gezeigt). Andererseits ist ebenso eine mögliche Anpassungsfähigkeit von Zellen an ein stabil verändertes Expressionsniveau von TRIM9 sowie eine mögliche Dosisabhängigkeit TRIM9-vermittelter Effekte als Erklärung für unterschiedliche Effekte einer vorübergehenden oder stabil veränderten TRIM9-Expression denkbar. So ist es beispielsweise möglich, dass ein zu hohes Expressionsniveau von TRIM9 zytostatische oder zytotoxische Effekte hat, die über eine Suppression des Wirtszellmetabolismus ebenfalls inhibierend auf die Virusreplikation wirken. Mikroskopisch konnte dies bezüglich mittels *live cell imaging* gezeigt werden, dass sich transient TRIM9-überexprimierende A549-Zellen nicht mehr teilen¹. Auch die Beobachtung, dass im Rahmen der Etablierung stabil TRIM9-überexprimierender Zellklone auf mRNA-Ebene lediglich eine zweieinhalbfache Steigerung der TRIM9-Expression gegenüber dem Wildtyp erreicht wurde, während die Mehrzahl der transduzierten Zellen verstarb, ist ein weiterer Hinweis für eine möglicherweise zytopathische Wirkung von zu hoch exprimiertem TRIM9 (siehe Abb. 3.2.10).

¹Die zugehörigen Experimente mit entsprechenden konfokalmikroskopischen *live-cell-imaging*-Aufnahmen wurden von Dr. Dharmendra Pandey durchgeführt und sind nicht als Bestandteil dieser Arbeit aufgeführt.

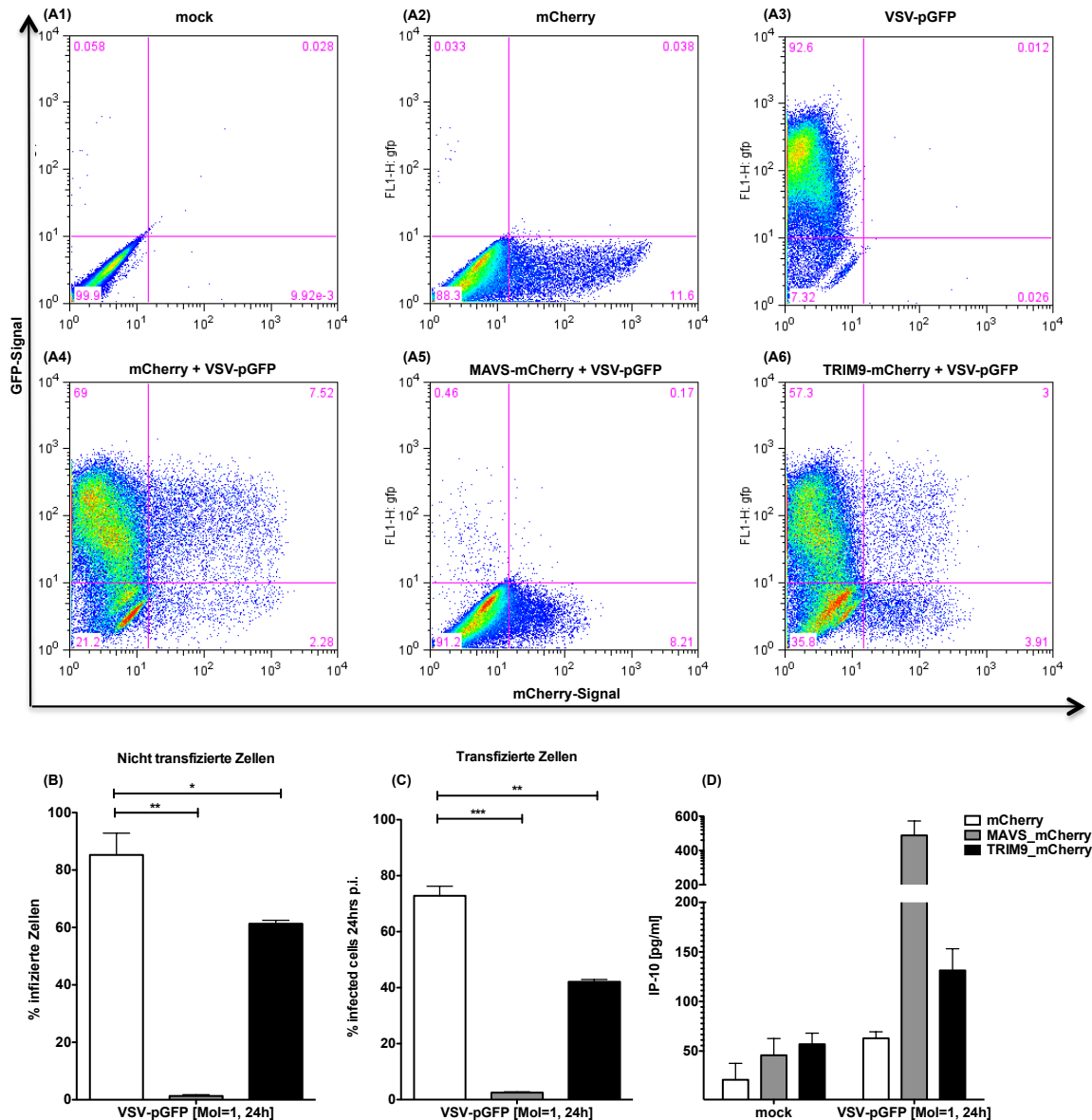


Abbildung 3.3.8: Die transiente Überexpression der langen TRIM9-Isoform hat in der Zelllinie A549 einen inhibitorischen Effekt auf die Virusreplikation von VSV und führt zu einer gesteigerten prä- und postinfektiösen Sekretion von IP-10. Es wurden 300.000 A549-WT-Zellen pro *well* in 6-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 12 Stunden erfolgte die Transfektion von Expressionsplasmiden (jeweils 1 μ g pro *well*), die für mCherry beziehungsweise für durch mCherry fluoreszenzmarkiertes TRIM9 oder MAVS kodierten. 24 Stunden nach der Transfektion folgte die Infektion mit VSV-p-GFP (800.000 PFUs pro *well* entsprechend einer MoI von circa 1). Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen abtrypsinisiert, in vierprozentiger PFA-Lösung fixiert, verbliebene Viren wurden mittels hochenergetischem UV-Licht inaktiviert und die Zellsuspension wurde zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet. Die Konzentrationen von IP-10 in den Zellüberständen wurden mittels ELISA bestimmt. In (A1-A3) ist aus einem repräsentativen Experimentdurchlauf die Zellpopulation (A1), das aufkommende Fluoreszenzsignal durch die Expression von mCherry (A2) sowie durch die Infektion mit VSV-p-GFP (A3) illustriert. In (A4-A6) ist ebenfalls aus einem repräsentativen Experimentdurchlauf der prozentuale Anteil infizierter Zellen in Abhängigkeit von den transfizierten Expressionsplasmiden mit Angabe jeweiliger Transfektionseffizienzen dargestellt. In (B-C) ist der prozentuale Anteil infizierter Zellen als Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimentdurchläufen ($n=3$ für B-C) dargestellt; die Signifikanzanalyse erfolgte durch den Student t-Test mit Angabe der Signifikanzniveaus $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$. In (D) sind die IP-10-Konzentrationen der Zellüberstände als Mittelwerte \pm SEM aus zwei unabhängigen Experimentdurchläufen dargestellt. Eine Signifikanzanalyse erfolgte hier bei $n=2$ für D nicht.

3.3.1.3 Keine Kolokalisation von TRIM9 und VSV

Weiterhin wurde überprüft, ob die intrazelluläre Lokalisation von TRIM9 von einer Virusinfektion beeinflusst wird, beziehungsweise ob TRIM9 während einer Infektion möglicherweise mit den Orten der Virusreplikation kolokalisiert vorliegt.

Hierfür wurde in einem ersten Schritt ein für C-terminal mittels mCherry fluoreszenzmarkiertes TRIM9l kodierendes Expressionsplasmid kloniert und die intrazelluläre Lokalisation im Rahmen einer transienten Überexpression mit der von N-terminal mittels GFP fluoreszenzmarkiertem TRIM9l verglichen. Es zeigte sich dabei in den Zelllinien 1205Lu und HEK293, dass die C-terminale Fluoreszenzmarkierung mittels mCherry ein vermehrt streifenförmig mikrotubuliassoziiertes Verteilungsmuster bedingt, während die N-terminale Fluoreszenzmarkierung mittels GFP zu einer vermehrt punktförmigen Lokalisation in Form intrazellulärer Verdichtungen führte (siehe Abb. 3.3.9).

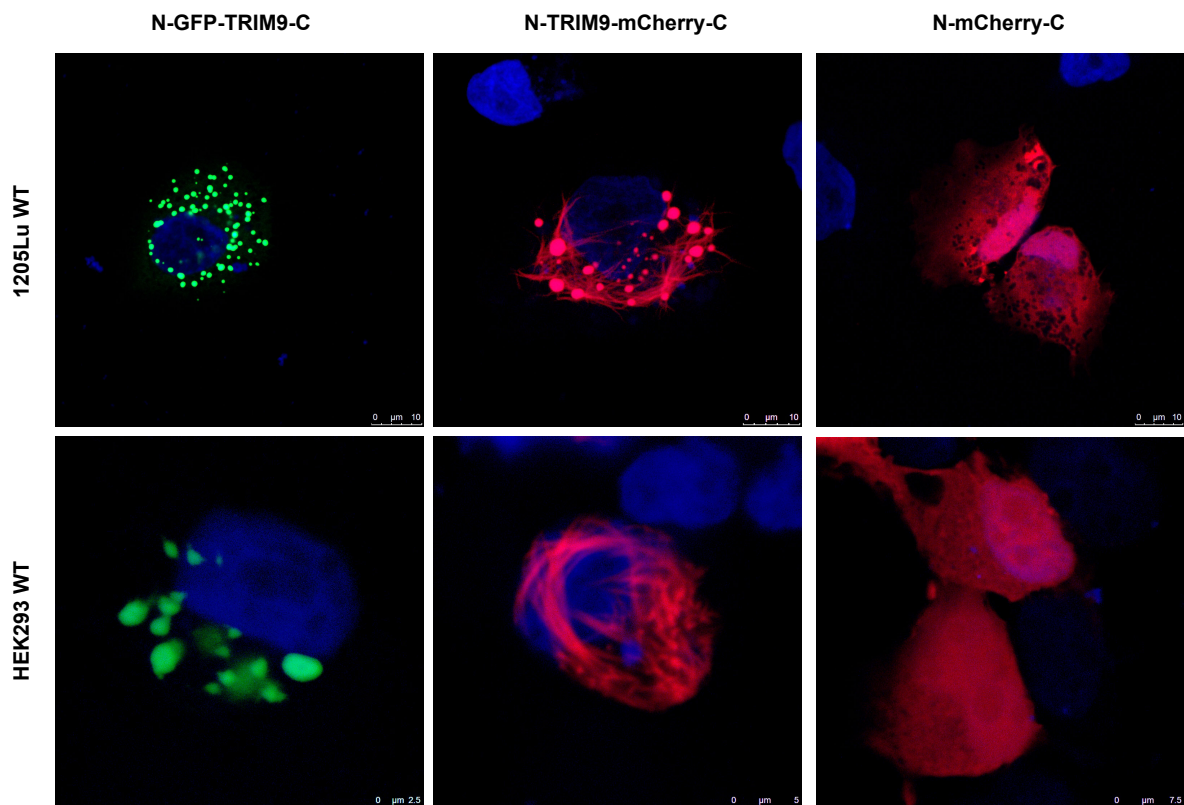


Abbildung 3.3.9: Fluoreszenzmarkiertes TRIM9l hat bei transientser Überexpression sowohl ein streifenförmiges, möglicherweise mikrotubuliassoziiertes Verteilungsmuster als auch die Form intrazellulär-punktförmiger Verdichtungen. Dabei scheint die N-terminale GFP-Markierung ein punktförmiges und die C-terminale mCherry-Markierung ein streifenförmiges Verteilungsmuster zu begünstigen. Nach Ausplattieren von 50.000 1205Lu-WT-Zellen oder HEK293-WT-Zellen pro well auf Deckgläsern im 24-well-Format wurden am nächsten Tag folgende Expressionsplasmide (350 ng pro /well) transfiziert: „N-GFP-TRIM9-C“, „N-TRIM9-mCherry-C“, „N-mCherry-C“. Es folgte die Fixation in vierprozentiger PFA-Lösung, das Anfärben von Nukleinsäuren mittels „Hoechst33342“ sowie das Aufbringen auf einen Objektträger. Mittels konfokaler Mikroskopie wurden intrazelluläre Verteilungsmuster analysiert.

Des Weiteren wurde eine mögliche Kolokalisation von TRIM91 und fluoreszenzmarkiertem VSV (Fusion des viralen Phosphoproteins mit GFP) untersucht. In der Zelllinie HEK293 stellte sich dabei heraus, dass TRIM91 auch während einer Infektion mit VSV weiterhin in streifenförmigen Verteilungsmustern lokalisiert bleibt und intrazellulär dabei nicht mit dem VSV-Phosphoprotein kolokalisiert vorliegt (siehe Abb. 3.3.10)

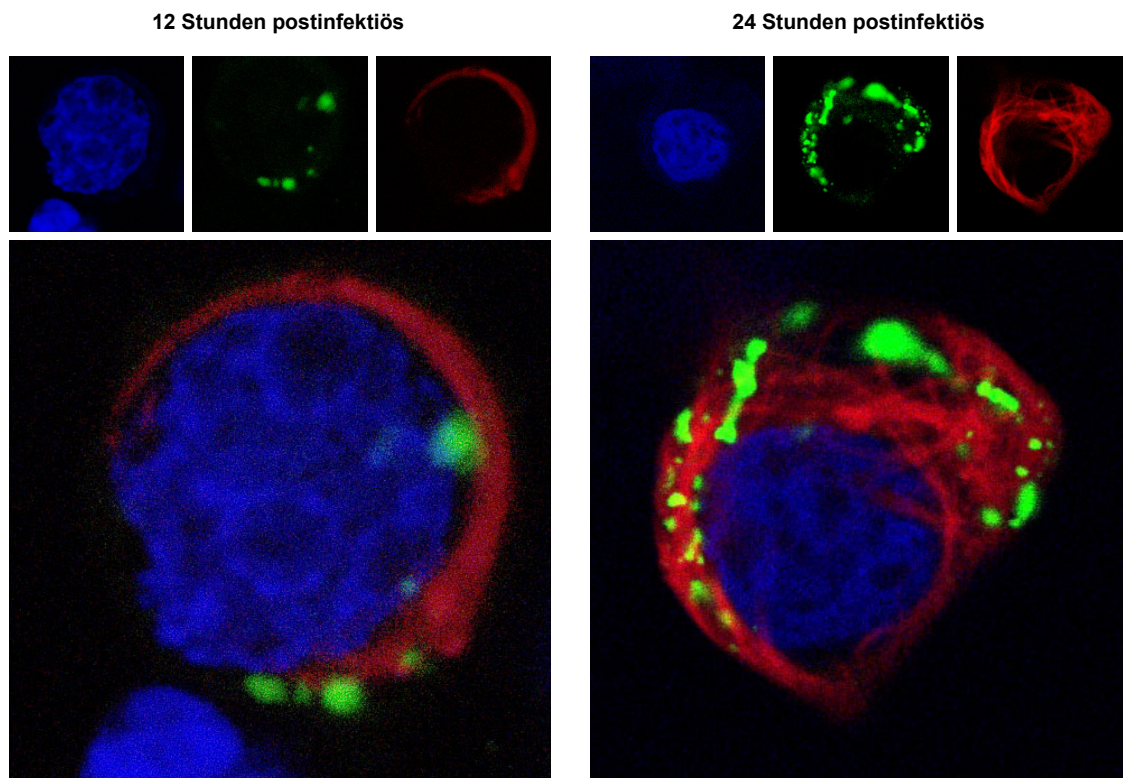


Abbildung 3.3.10: TRIM91 ist im Rahmen einer Infektion mit VSV weiterhin in mikrotubuliassozierten Verteilungsmustern lokalisiert. Es zeigt sich keine Kolokalisation von TRIM9 und dem VSV-Phosphoprotein in der Zelllinie HEK293. Nach Ausplattieren von 50.000 HEK293-Zellen pro *well* auf Deckgläsern im 24-*well*-Format wurden die Zellen am Folgetag mit dem Expressionsplasmid „N-TRIM9-mCherry-C“ (350 ng pro *well*) transfiziert. 24 Stunden später erfolgte die Infektion mit VSV-p-GFP (MoI 1). Zwölf Stunden und 24 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen in vierprozentiger PFA-Lösung fixiert, Nukleinsäuren mittels „Hoechst33342“ angefärbt und die Deckgläser auf Objektträger aufgebracht. Mittels konfokaler Mikroskopie wurden intrazelluläre Verteilungsmuster analysiert.

3.3.2 Infektionen mit (+)ssRNA-Viren

Nachdem für (-)ssRNA-Virus-Infektionen (vor allem für VSV-Infektionen und hinsichtlich der virus-induzierten Immunantwort für Sendai-Virus-Infektionen) eine mit der TRIM9-Defizienz assoziierte, signifikante Inhibition der Virusreplikation demonstriert werden konnte, wurde im folgenden Abschnitt ein möglicher Einfluss der Expression von TRIM9 auf die Replikation von (+)ssRNA-Viren sowie auf die in diesem Rahmen induzierte Zytokinantwort untersucht.

3.3.2.1 Virusreplikation und Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen

In der Zelllinie 1205Lu konnte auch für (+)ssRNA-Viren ein signifikanter Einfluss des TRIM9-Expressionsniveaus auf die Virusreplikation sowie auf die virusinduzierte Immunantwort gemessen werden.

Dabei zeigte sich zunächst, dass sowohl das Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) als auch das *Semliki-forest*-Virus (SFV) in allen verwendeten 1205Lu-Zellklonen replizieren können, da einige Stunden nach Infektion im Überstand der Zellen deutlich höhere Zahlen von Viruspartikeln gefunden werden konnten, als für die Infektion verwendet wurden (siehe Abb. 3.3.11). In TRIM9-defizienten Zellen war im Vergleich zum Wildtyp darüber hinaus eine signifikante Inhibition der Virusreplikation beider Viren zu beobachten (siehe Abb. 3.3.11, B/D). Während dieser Phänotyp hinsichtlich der Virusreplikation demjenigen im Rahmen von Infektionen mit VSV glich, waren hinsichtlich der virusinduzierten Immunantwort deutliche Unterschiede sichtbar: Während TRIM9-defiziente Zellen nach einer Infektion mit VSV eine verminderte Immunantwort zeigten, waren im Rahmen der Infektion mit EMCV und SFV in TRIM9-defizienten Zellen gesteigerte Sekretionen von IP-10 nachweisbar (siehe Abb. 3.3.11, A/C).

Derselbe Effekt zeigte sich auch im Rahmen einer Infektion mit dem Gelbfieber-Impf-Virus (*yellow fever virus*, YFV). Es konnte auch für YFV eine Replikationskompetenz in den verwendeten 1205Lu-Zellklonen demonstriert werden: Während die Virionenlast im Zellüberstand 24 Stunden postinfektiös unter den Infektionstiter sank, näherte sich innerhalb weiterer 48 Stunden die Virionenlast im Zellüberstand TRIM9-defizienter Zellen wieder dem Infektionstiter an und überstieg diesen im Überstand der Wildtypzellen deutlich. Damit konnte auch im Rahmen der YFV-Infektion für TRIM9-defiziente Zellen im Wildtypvergleich eine signifikante Inhibition der Virusreplikation demonstriert werden (siehe Abb. 3.3.12, B/D). Weiter ist im Überstand TRIM9-defizienter Zellen nach einer YFV-Infektion eine im Vergleich zum Wildtyp gesteigerte Sekretion von IP-10 nachweisbar gewesen, sodass dieser Phänotyp jenem nach Infektion mit EMCV und SFV gleicht (siehe Abb. 3.3.12, A/C).

Weiterhin wurde der Einfluss des TRIM9-Expressionsniveaus im Rahmen einer Infektion mit Mengo-Virus untersucht. Dabei zeigte sich hierbei im Gegensatz zu SFV, EMCV und YFV jedoch keine klare Replikationskompetenz des Mengo-Virus in 1205Lu-Zellen: Sowohl 24 Stunden als auch 48 Stunden postinfektiös stagnierte die Virionenlast in den Zellüberständen knapp unterhalb des Infektionstiters (siehe Abb. 3.3.13, A/C). Ob hierbei die Virusreplikation im engeren Sinne oder andere Teile des viralen Lebenszyklus (*entry, assembly, budding*) gestört sind, wurde an dieser Stelle nicht weiter geklärt. Trotz insuffizienter Virusreplikation war im Rahmen der Infektion jedoch eine höhere IP-10-Sekretion im Überstand von TRIM9-defizienten Zellen nachweisbar als im Überstand von Wildtypzellen (siehe Abb. 3.3.13, B/D).

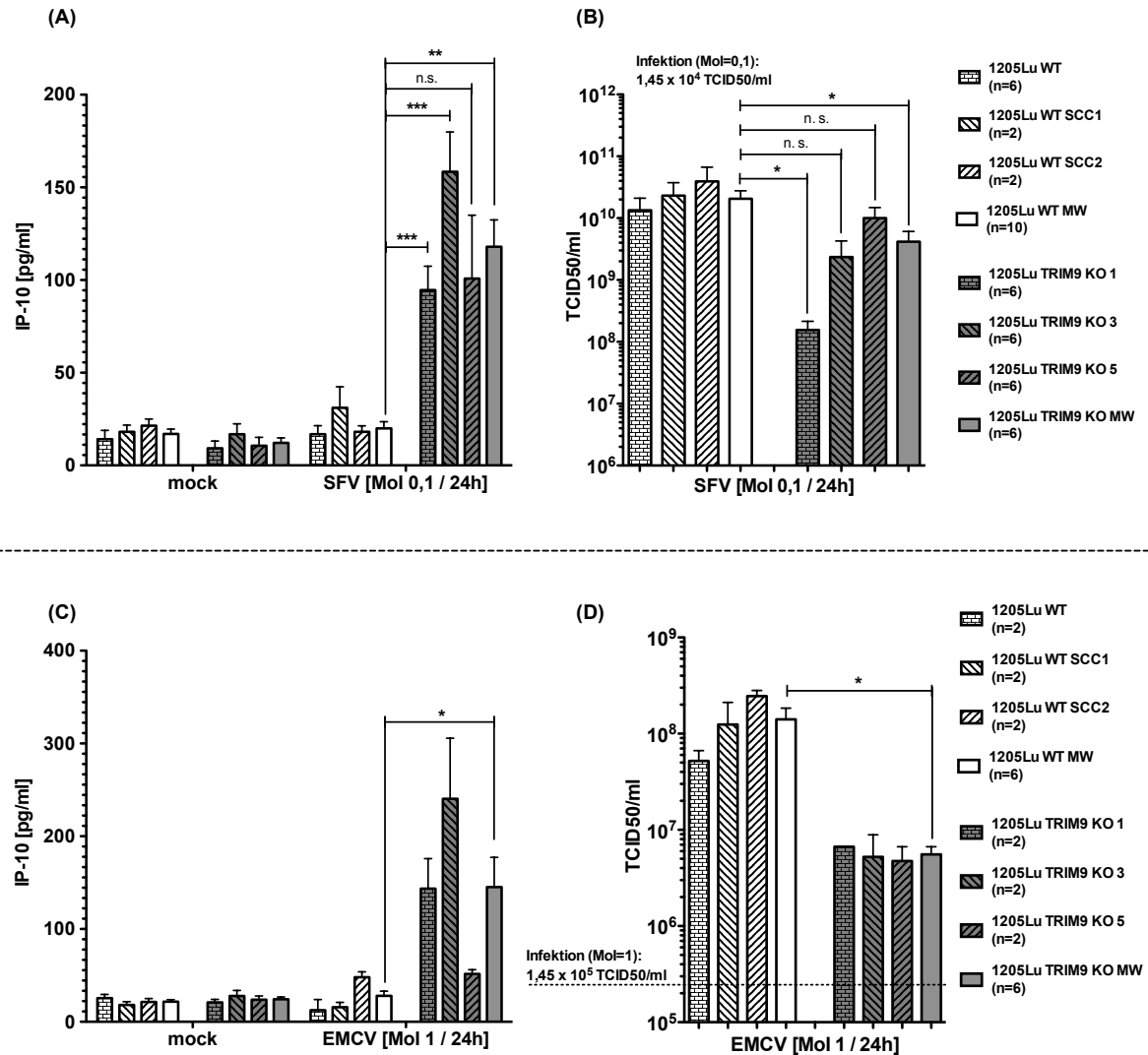


Abbildung 3.3.11: EMCV und SFV replizieren schlechter in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen und induzieren in ihnen mehr IP-10 als in 1205Lu-WT-Zellen. Drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden jeweils mit 100.000 Zellen pro *well* auf einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert. Dabei wurden als zusätzliche Wildtypkontrollen sowie als Kontrolle der im Rahmen der CRISPR/Cas-Editierung stattgefundenen Einzelzellklonierung zusätzlich zur 1205Lu-WT-Zelllinie die aus dieser durch Einzelzellverdünnung und klonale Expansion etablierten Zelllinien 1205Lu-WT-SSC-1 und 1205Lu-WT-SSC-2 in einige Experimentdurchläufe miteinbezogen. 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen erfolgte die Infektion mit SFV (MoI 0,1) oder EMCV (MoI 1). Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Abnahme der Zellüberstände, aus denen mittels ELISA die Konzentrationen von IP-10 (A/C) sowie mittels TCID50-assays die Virustiter (B/D) bestimmt wurden. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus allen in der Grafik als „n“ angegebenen, unabhängigen Experimenten für alle Zelllinien einzeln angegeben. Zusätzlich ist der Mittelwert aus allen drei 1205Lu-WT-Zelllinien (1205Lu WT MW) sowie aus allen drei TRIM9-defizienten Zelllinien (1205Lu TRIM9 KO MW) angegeben. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für die markierten Vergleiche bestimmt und sind angegeben als *= $p<0.05$, **= $p<0.01$, ***= $p<0.001$, n.s.=nicht signifikant.

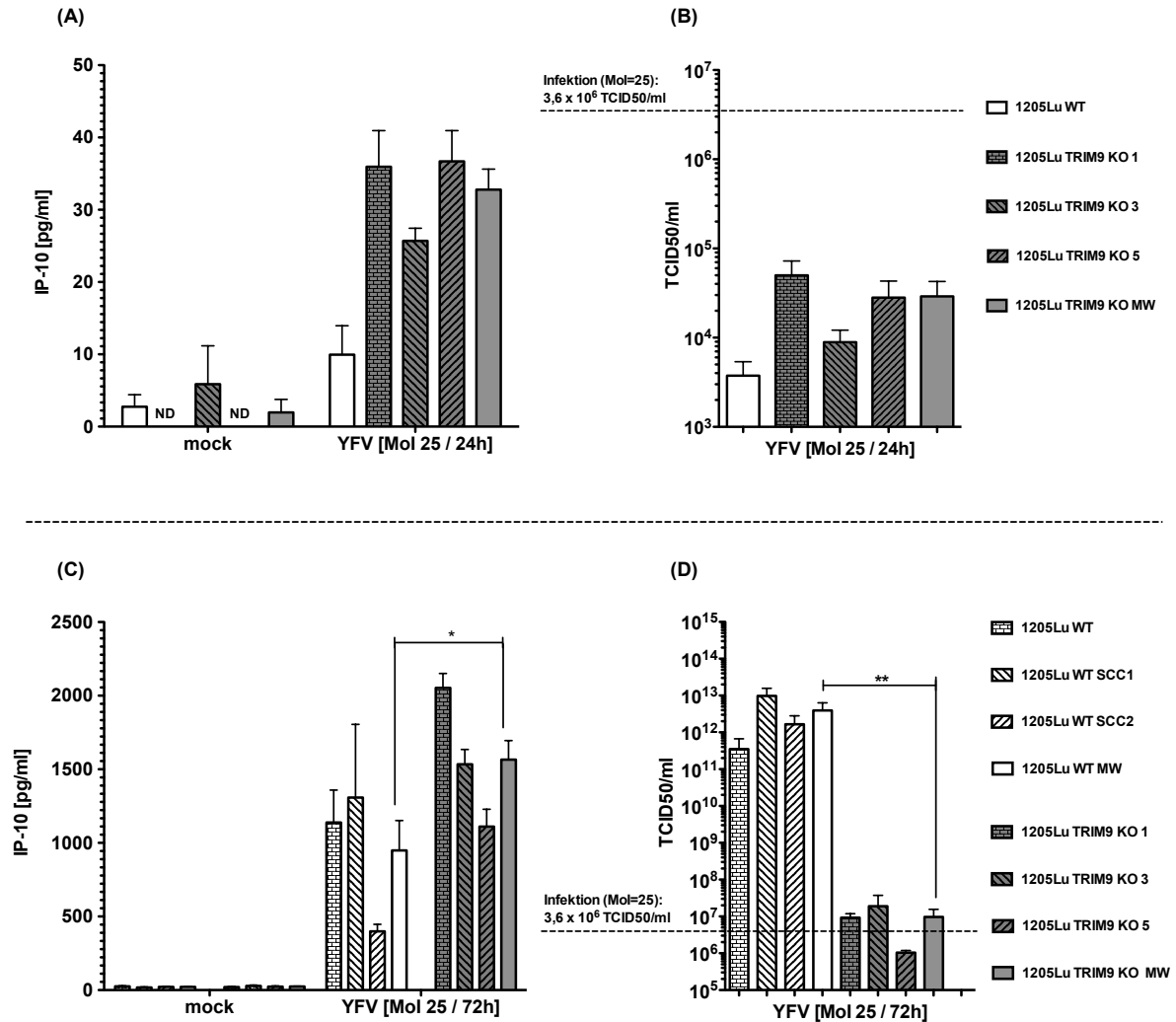
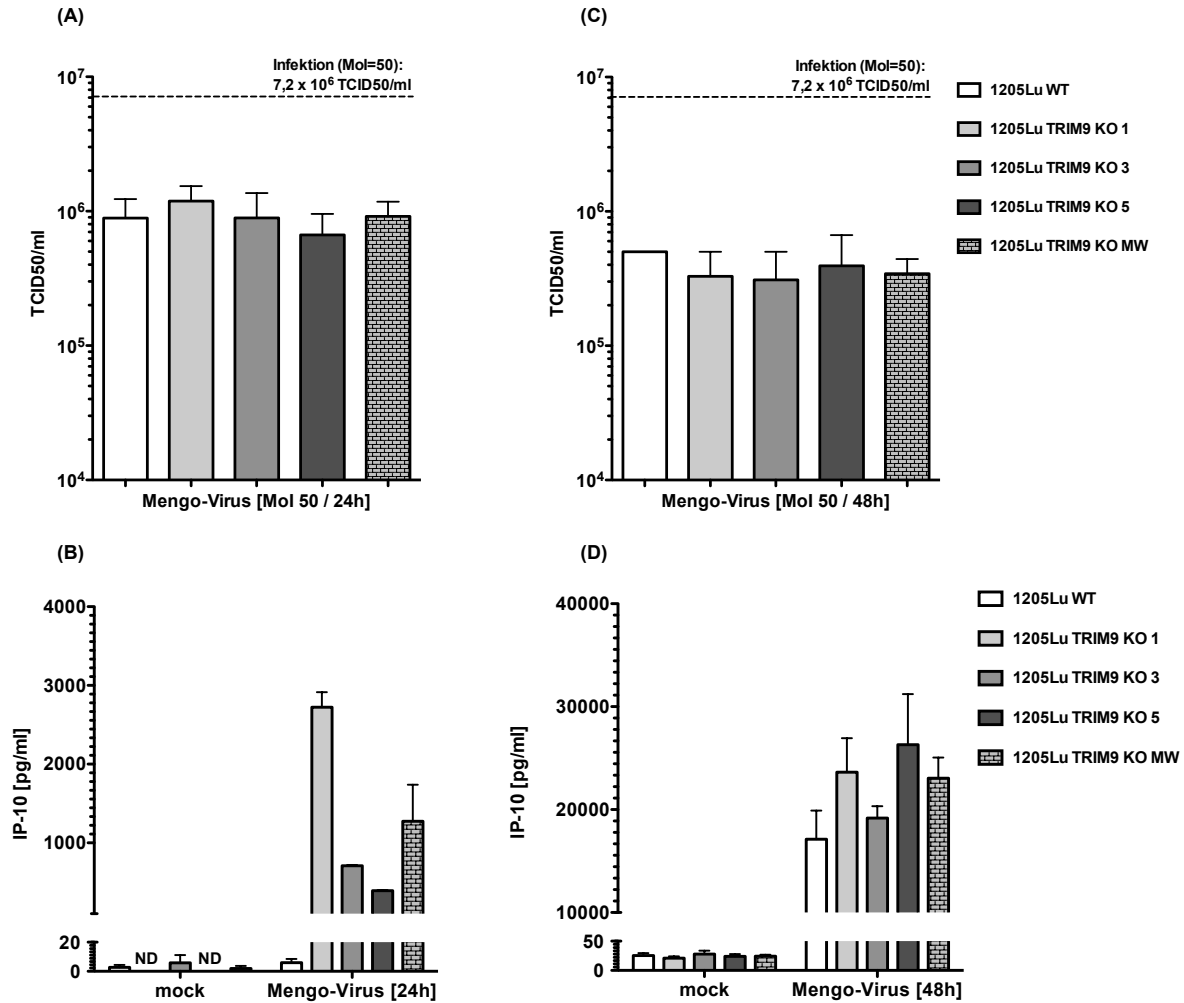


Abbildung 3.3.12: Das YF-Impf-Virus (YFV) repliziert schlechter in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen und induziert in ihnen mehr IP-10 als in 1205Lu-WT-Zellen. Drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden jeweils mit 100.000 Zellen pro *well* auf einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert. Dabei wurden als zusätzliche Wildtypkontrollen sowie als Kontrolle der im Rahmen der CRISPR/Cas-Editierung stattgefundenen Einzelzellklonierung zusätzlich zur 1205Lu-WT-Zelllinie die aus dieser durch Einzelzellverdünnung und klonale Expansion etablierten Zelllinien 1205Lu-WT-SSC-1 und 1205Lu-WT-SSC-2 in einige Experimentdurchläufe miteinbezogen. 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen erfolgte die Infektion mit YFV (MoI 25). Nach weiteren 24 Stunden (A/B) sowie 72 Stunden (C/D) erfolgte die Abnahme der Zellüberstände, aus denen mittels ELISA die Konzentrationen von IP-10 (A/C) sowie mittels TCID50-assays die Virustiter (B/D) bestimmt wurden. **(A/B):** Die Auswertung 24 Stunden postinfektios erfolgte in einem einmalig durchgeführten Experiment (**einzel n=1**). Auf Basis des in Triplikaten durchgeführten ELISA sowie des in acht Replikaten durchgeführten TCID50-assays sind die Daten als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) dargestellt. Zusätzlich erfolgte ein *pooling* der Daten einzelner 1205Lu-TRIM9-KO-Klone, welches als 1205Lu-TRIM9-KO-MW (MW **n=3**) dargestellt ist. **(C/D):** Die Daten sind als Mittelwerte +SEM auf Basis zwei unabhängig durchgeführter Experimentdurchläufe (**einzel n=2**) für die 1205Lu-Zellklone einzeln dargestellt sowie zusätzlich *gepoolt* als Mittelwert der verwendeten 1205Lu-WT-Zelllinien sowie 1205Lu-TRIM9-KO-Zelllinien (**WT MW / KO MW n=6**). Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für die markierten Vergleiche bestimmt und sind angegeben als *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$.



Abbildungung 3.3.13: Mengo-Virus kann in der Zelllinie 1205Lu nicht suffizient replizieren (A/C). Trotzdem ist eine TRIM9-Defizienz-vermittelte Verstärkung der virusinduzierten Sekretion von IP-10 zu beobachten (B/D). Drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden jeweils mit 100.000 Zellen pro *well* auf einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert. 24 Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen erfolgte die Infektion mit Mengo-Virus (Mol 50). Nach weiteren 24 Stunden (A/B) sowie 48 Stunden (C/D) erfolgte die Abnahme der Zellüberstände, aus denen mittels ELISA die Konzentrationen von IP-10 (B/D, ND=unterhalb der Nachweisgrenze) sowie mittels TCID₅₀-assays die Virustiter (A/C) bestimmt wurden. **(A/B):** Die Auswertung 24 Stunden postinfektiös erfolgte in einem einmalig durchgeführten Experiment (**einzelnen n=1**). Auf Basis des in Triplikaten durchgeführten ELISA sowie des in acht Replikaten durchgeführten TCID₅₀-assays sind die Daten als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) dargestellt. Zusätzlich erfolgte ein *pooling* der Daten einzelner 1205Lu-TRIM9-KO-Klone, welches als 1205Lu-TRIM9-KO-MW (**MW n=3**) dargestellt ist. **(C/D):** Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus zwei unabhängigen Experimentendurchläufen für die 1205Lu-Zellklone einzeln (**einzelnen n=2**) dargestellt sowie zusätzlich *gepoolt* als Mittelwert der verwendeten 1205Lu-TRIM9-KO-Zelllinien (**KO MW n=6**).

Es konnte damit gegensätzlich zu Infektionen mit (-)ssRNA-Viren (VSV, SeV) für Infektionen mit (+)ssRNA-Viren (SFV, EMCV, YFV, Mengo-Virus) eine gesteigerte Sekretion von IP-10 für TRIM9-defiziente Zellen im Wildtypvergleich gezeigt werden. Ebenso war für alle in der Zelllinie 1205Lu replikationskompetenten (+)ssRNA-Viren (SFV, EMCV, YFV) eine durch die TRIM9-

Defizienz bedingte Inhibition der Virusreplikation nachweisbar. Damit bleibt die Möglichkeit offen, dass gegensätzlich zu VSV während der Infektion aller getesteten (+)ssRNA-Viren primär die Immunantwort durch die TRIM9-Defizienz beeinflusst wird und - bedingt durch deren Verstärkung - die Virusreplikation sekundär inhibiert wird.

3.3.2.2 Stimulation mit RNA-Isolaten HCV-infizierter Zellen

Da eine Assoziation eines SNPs der TRIM9-3'UTR mit dem Verlauf einer HCV-Infektion der Auslöser für dieses Projekt war, wurde insbesondere untersucht, ob TRIM9 einen Einfluss auf die HCV-induzierte Immunantwort sowie auf die resultierende Virusreplikation hat.

Aus Sicherheitsgründen konnte im Rahmen dieser Arbeit nur mit RNA-Isolaten aus Hepatitis-C-infizierten Zellen gearbeitet werden, sodass auf dieser Grundlage im Wesentlichen die durch die genomische RNA des Virus beziehungsweise durch auftretende Replikationsintermediate induzierte Immunantwort in Abhängigkeit von dem TRIM9-Expressionsniveau charakterisiert wurde¹. So ist nach Transfektion genomischer Hepatitis-C-RNA eine Virusreplikation aufgrund der positiven Polarität möglich, aufgrund des Hepatotropismus des Hepatitis-C-Virus ist jedoch davon auszugehen, dass es durch gegebenenfalls sezernierte Virionen innerhalb der Melonomzelllinie 1205Lu nicht zur Neuinfektion der Zellen kommt. Es zeigte sich nach Transfektion der RNA-Isolate in der Zelllinie 1205Lu im Wildtypvergleich eine signifikant gesteigerte IP-10-Sekretion in TRIM9-defizienten Zellen. Damit gleicht dieser Phänotyp einer gesteigerten Immunantwort der bereits im Rahmen der Infektion mit anderen (+)ssRNA-Viren demonstrierten Steigerung der Sekretion von IP-10 in Abwesenheit von TRIM9.

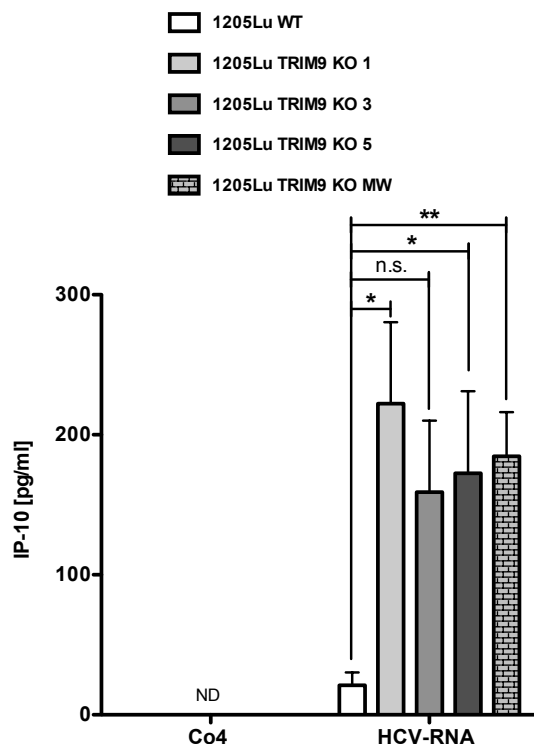


Abbildung 3.3.14: Die Transfektion von RNA-Isolaten aus HCV-infizierten Zellen induziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen höhere Mengen an IP-10 als in 1205Lu-Wildtypzellen. Drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden jeweils mit 100.000 Zellen pro *well* auf einer 24-*well*-Flachbodenplatte ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion von RNA-Isolaten Hepatitis-C-infizierter Huh7.5-Zellen¹ (1 µg pro *well*) sowie als Kontrolle die Transfektion von nicht immunstimulatorischer Co4-RNA. 18 Stunden nach der Transfektion wurden die Konzentrationen von IP-10 in den Zellüberständen mittels eines für jeden Experimentdurchlauf in Triplikaten durchgeführten ELISA (ND = unterhalb der Nachweisgrenze) gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus fünf unabhängigen Experimentwiederholungen für alle Zelllinien einzeln (**einzel n=5**) sowie als Mittelwert aller 1205Lu-TRIM9-KO-Klone (**KO MW n=15**) dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für die markierten Vergleiche bestimmt und sind angegeben als *=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001, n.s.=nicht signifikant.

¹Die RNA-Isolate Hepatitis-C-infizierter Huh7.5-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Protzer (Institut für Virologie der Technischen Universität München) bereitgestellt.

3.4 Modulation der Signalwege des angeboren antiviralen Immunsystems durch TRIM9

Abschnittsüberblick	Seite
3.4.1 TRIM9 als Inhibitor der Aktivierung von NF- κ B	80
3.4.2 Der Einfluss von TRIM9 auf die RLR-induzierte Immunantwort	83
3.4.2.1 Der Einfluss des TRIM9- <i>knock-outs</i> auf die RLR-induzierte Immunantwort	84
3.4.2.2 Die Hemmung der RLR-induzierten Zytokinantwort nach siRNA- <i>knock-down</i> von TRIM9 beruht auf einem TRIM9-unabhängigem Nebeneffekt der siRNA	88
3.4.3 Kein Einfluss der TRIM9-Expression auf die Interferon- β -induzierte Sekretion von IP-10	91
3.4.4 Gesteigerte TLR3-induzierte Zytokinantwort in TRIM9-defizienten Zellen	92
3.4.5 Gesteigerte Induktion von ISG-15 in TRIM9-defizienten Zellen	95

3.4.1 TRIM9 als Inhibitor der Aktivierung von NF- κ B

Kürzlich wurde durch Shi et al. ein molekularer Mechanismus beschrieben, über den TRIM9 eine inhibitorisch regulative Wirkung auf die Aktivierung von NF- κ B ausübt, siehe Abschnitt 1.2.3.2 [Shi et al., 2014]. Vor dem Hintergrund eines möglichen Zusammenhanges mit dem in Abschnitt 3.3 gezeigten Phänotyp einer von dem TRIM9-Expressionsniveau abhängigen Virusreplikation sowie virusinduzierten Immunantwort wurde der Einfluss von TRIM9 auf die Aktivierung von NF- κ B mit den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Zelllinien experimentell untersucht.

Dazu erfolgte die Stimulation der verschiedenen TRIM9-defizienten sowie TRIM9-überexprimierenden Zellen durch TNF- α beziehungsweise Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA). Die dadurch induzierte Aktivierung von NF- κ B im Vergleich zu Wildtypzellen wurde mit NF- κ B-Reporterkonstrukten basierend auf dem Prinzip dualer Luciferase-*assays* (siehe Abschnitt 2.1.1.3) quantifiziert. Dabei basiert die TNF- α -induzierte NF- κ B-Aktivierung auf der I κ B-Enzymkomplex-vermittelten Phosphorylierung und dem folgenden, proteasomalen Abbau von I κ B α . Die PMA-induzierte NF- κ B-Aktivierung basiert auf der PMA-vermittelten Aktivierung mehrerer Isoformen der Proteinkinase C, welche über eine Aktivierung von IKK β ebenfalls den proteasomalen Abbau von I κ B α induzieren. Sowohl TNF- α als auch PMA aktivieren damit den kanonischen NF- κ B-Signalweg. Während die Zelllinie HEK293 sensitiv gegenüber TNF- α ist, sind die Zelllinien A549 und 1205Lu als weniger

sensitiv gegenüber $\text{TNF-}\alpha$ beschrieben worden [Manna and Aggarwal, 2000]. Die Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ erfolgte hier ausschließlich durch Stimulation mit PMA.

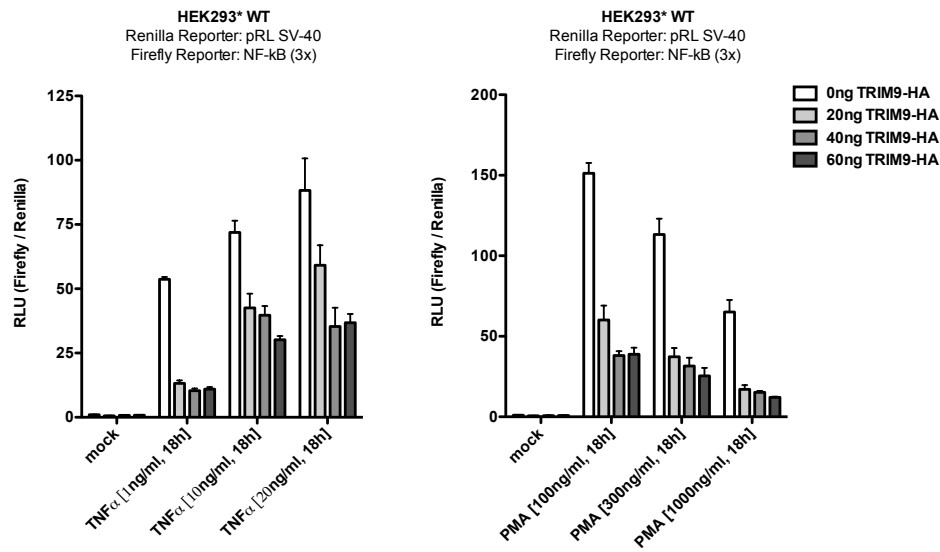


Abbildung 3.4.1: Die transiente Überexpression von TRIM91 inhibiert die $\text{TNF-}\alpha$ - und PMA-induzierte $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung in der Zelllinie HEK293. 25.000 HEK293*-WT-Zellen¹ wurden pro *well* in 96-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion von je 40 ng des „3x-NF- κ B-*Firefly*-Reporterplasmids“ und „*Renilla*-Kontrollplasmids“ sowie zeitgleich die Transfektion der angegebenen Mengen eines TRIM9-Expressionsplasmids. Die Menge eines zugesetzten Leervektors wurde in jeder Stimulationsbedingung vor dem Hintergrund einer konstanten, transfizierten Gesamtmenge an Plasmiden von 140 ng pro *well* gewählt. Sechs Stunden später wurden die Zellen unter Austausch des Mediums mit den angegebenen Mengen PMA beziehungsweise $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert. Nach weiteren 18 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Aktivität beider Luciferasen wurde nach Substratzugabe mittels Lumineszenz ausgelesen. Das Experiment wurde hinsichtlich aller Messwerte in Triplikaten durchgeführt, jedoch nicht zu unabhängigen Zeitpunkten wiederholt ($n=1$). Die Daten sind als Mittelwerte +SEM auf Basis der Triplikate (hier als methodischer Fehler) als Verhältnis von *Firefly*- zu *Renilla*-Luciferaseaktivität angegeben. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

In der Zelllinie HEK293*¹ wurde zunächst der Effekt einer transienten Überexpression von TRIM91 auf die $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ und PMA überprüft. Es zeigte sich der nach Shi et al. erwartete, dosisabhängig inhibitorische Effekt von TRIM91 auf die durch $\text{TNF-}\alpha$ sowie PMA induzierte $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung unabhängig von der Stimulationsintensität, siehe Abb. 3.4.1 [Shi et al., 2014].

Auch in der Zelllinie 1205Lu konnte ein dosisabhängig inhibitorischer Effekt von TRIM91 auf die PMA-induzierte Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ mittels transienter TRIM9-Überexpression nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.2, A). Damit konsistent zeigten TRIM9-defiziente 1205Lu-Zellen eine im Vergleich zu 1205Lu-WT-Zellen erwartungsgemäß gesteigerte $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivität nach Stimulation mit PMA. In Abbildung 3.4.2, B ist diesbezüglich ein repräsentatives aus mehreren Experimenten dargestellt. Der Effekt einer durch die TRIM9-Defizienz gesteigerten PMA-induzierten Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ konnte unter Verwendung eines zweiten $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Reporterplasmids reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

¹In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HEK293-WT-Zelllinien verwendet, siehe Abschnitt 3.2.3 und Tab. 1

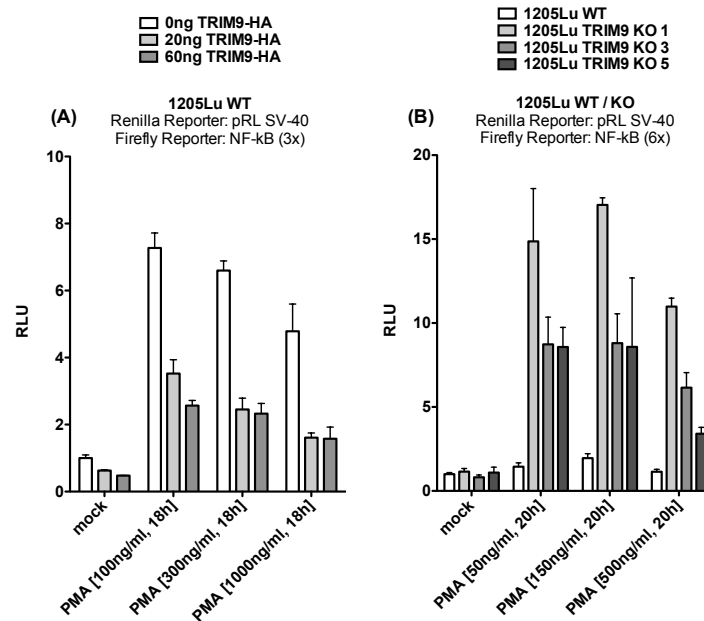


Abbildung 3.4.2: Die transiente Überexpression von TRIM91 inhibiert die PMA-induzierte NF- κ B-Aktivierung in der Zelllinie 1205Lu (A). Der *knock-out* beider TRIM9-Isoformen wirkt sich gegensätzlich fördernd auf die Aktivierung von NF- κ B aus (B). 1205Lu-WT-Zellen (A/B) sowie 1205Lu-TRIM9-KO-Zellen (B) wurden mit 30.000 Zellen pro *well* in 96-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion von je 40 ng eines *Firefly*-Reporterplasmids (A: „3x-NF- κ B-*Firefly*-Reporterplasmid“, B: „6x-NF- κ B-*Firefly*-Reporterplasmid“) und eines *Renilla*-Kontrollplasmids. Zusätzlich wurde im Rahmen der transienten TRIM9-Überexpression in (A) eine Plasmidmenge von 60 ng kotransfiziert, die neben einem Leervektor die in (A) angegebenen Mengen eines TRIM9-Expressionsplasmids beinhaltet. Sechs Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen unter Austausch des Mediums mit den angegebenen Mengen PMA stimuliert. Nach weiteren 18 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Aktivität beider Luciferasen wurde nach Substratzugabe mittels Lumineszenz ausgelesen. Das Experiment wurde hinsichtlich aller Messwerte in Triplikaten durchgeführt, jedoch nicht zu unabhängigen Zeitpunkten wiederholt ($n=1$). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM auf Basis der Triplikate (hier als methodischer Fehler) als Verhältnis von *Firefly*- zu *Renilla*-Luciferaseaktivität angegeben. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

Auch in der Zelllinie A549 konnte im Rahmen aller applizierten Dosierungen von PMA der dosisabhängig inhibitorische Effekt einer transienten Überexpression von TRIM91 auf die PMA-induzierte Aktivierung von NF- κ B nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.3, A). Zu dem Effekt einer transienten Überexpression von TRIM91 konsistent war der Unterschied zwischen der stabil TRIM91-überexprimierenden A549-Zelllinie und dem korrespondierenden Wildtyp: Auch die stabile Überexpression reduzierte die PMA-induzierte NF- κ B-Aktivierung im Wildtypvergleich (siehe Abb. 3.4.3, C). Dabei entsprach die Stärke des Effektes der stabilen Überexpression in etwa dem transienten Überexpressionseffekt unter der Verwendung von 20 ng TRIM9-HA-Plasmid. Konsistent zu dem Effekt der TRIM9-Überexpression zeigten beide TRIM9-defizienten A549-Klone erwartungsgemäß eine gesteigerte NF- κ B-Aktivierung nach Stimulation mit PMA im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp (siehe Abb. 3.4.3, B). Abbildung 3.4.3 stellt dabei drei repräsentative Experimente dar, welche jeweils auch unter Verwendung eines zweiten NF- κ B-Reporterplasmids (Daten nicht gezeigt) reproduzierbar gewesen sind.

Zusammenfassend konnte damit ein inhibitorischer Effekt von TRIM9 auf die NF- κ B-Aktivierung für die Zelllinien HEK293*¹, A549 sowie 1205Lu gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass nicht nur die Überexpression von TRIM9 die NF- κ B-Aktivierung beeinflusst, sondern auch der Wegfall der endogenen TRIM9-Expression einen gegenläufigen Effekt auf die NF- κ B-Aktivierung hat.

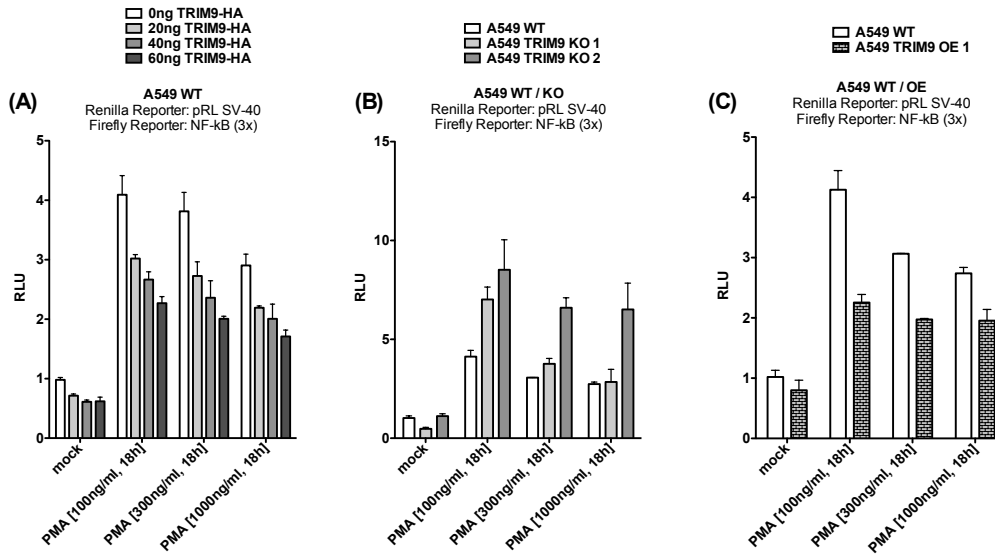


Abbildung 3.4.3: Die transiente Überexpression von TRIM9l (A) inhibiert ebenso wie die stabile Überexpression von TRIM9l (C) die PMA-induzierte NF- κ B-Aktivierung in der Zelllinie A549. Der *knock-out* beider TRIM9-Isoformen wirkt sich gegensätzlich fördernd auf die Aktivierung von NF- κ B aus (B). A549-WT-Zellen (A) sowie A549-TRIM9-KO-Zellen (B) beziehungsweise Zellen des A549-TRIM9-OE-Klons 1 (C) wurden mit jeweils 20.000 Zellen pro *well* in 96-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion von je 40 ng des „3x-NF- κ B-Firefly-Reporterplasmids“ und „Renilla-Kontrollplasmids“. Zusätzlich wurde im Rahmen der transienten TRIM9-Überexpression in (A) eine Plasmidmenge von 60 ng transfiziert, die neben einem Leervektor die in (A) angegebenen Mengen eines TRIM9-Expressionsplasmids beinhaltet. Sechs Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen unter Austausch des Mediums mit den angegebenen Mengen PMA stimuliert. Nach weiteren 18 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Aktivität beider Luciferasen wurde nach Substratzugabe mittels Lumineszenz ausgelesen. Das Experiment wurde hinsichtlich aller Messwerte in Triplikaten durchgeführt, jedoch nicht zu unabhängigen Zeitpunkten wiederholt ($n=1$). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM auf Basis der Triplikate (hier als methodischer Fehler) als Verhältnis von *Firefly*- zu *Renilla*-Luciferaseaktivität angegeben. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

3.4.2 Der Einfluss von TRIM9 auf die RLR-induzierte Immunantwort

Um mögliche Einflüsse der TRIM9-Expression auf das *downstream-signaling* RIG-I-ähnlicher-Rezeptoren (RLRs) sowie Einflüsse auf die Induktion von *interferon stimulated genes* (ISGs) zu untersuchen, wurden im Folgenden nicht virale Stimulantien getestet. Dadurch kann die konstante und reproduzierbare Stimulation definierter Mustererkennungsrezeptoren in einer von der Virusreplikation unabhängigen Art sichergestellt werden.

¹In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene HEK293-WT-Zelllinien verwendet, siehe Abschnitt 3.2.3 und Tab. 1

3.4.2.1 Der Einfluss des TRIM9-*knock-outs* auf die RLR-induzierte Immunantwort

Nach Aktivierung von RIG-I und MDA5 durch synthetische Liganden wurde der Einfluss des TRIM9-Expressionsniveaus auf die resultierende Induktion verschiedener Zytokine charakterisiert. Dabei wurde die Genexpression verschiedener Zytokine zu spezifischen Zeitpunkten mittels qRT-PCR und die zeitlich kumulative Sekretion von IP-10 sowie IL-6 mittels ELISA quantifiziert.

Um eine RLR-vermittelte Immunantwort auszulösen, erfolgte die Stimulation von MDA5 durch Transfektion hochmolekularer Polyinosin-Polycytosin-Säure (pI:C) sowie die Stimulation von RIG-I durch Transfektion von mittels *In-vitro*-Transkription hergestellter Triphosphat-RNA (3pRNA). Um zeitgleich eine potentielle Aktivierung von TLR3 durch nicht transfizierte Anteile des zugegebenen pI:C zu reduzieren, erfolgte in einigen Experimenten vorab die Zugabe von Chloroquin. In Abschnitt 3.1.2 konnte eine Steigerung der MDA5-Spezifität durch Zugabe von Chloroquin demonstriert werden (siehe Abb. 3.1.3).

In der Zelllinie 1205Lu konnte kein signifikanter Einfluss der TRIM9-Expression auf die kumulative Sekretion von IP-10 innerhalb von 24 Stunden nach Aktivierung von RIG-I nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.4.4). Ebenso hinsichtlich der MDA5-induzierten Sekretion von IP-10 innerhalb von 24 Stunden nach Transfektion von pI:C und vorheriger Applikation von Chloroquin konnte kein signifikanter Effekt der TRIM9-Expression gezeigt werden (siehe Abb. 3.4.5). Dabei wurden durch Miteinbeziehung der aus der Wildtypzelllinie entstandenen Einzelzellklone 1205Lu-WT-SSC-1 und 1205Lu-WT-SSC-2 zusätzlich potentielle Nebeneffekte der im Rahmen der CRISPR/Cas9-Geneditierung stattgefundenen Einzelzellklonierung kontrolliert.

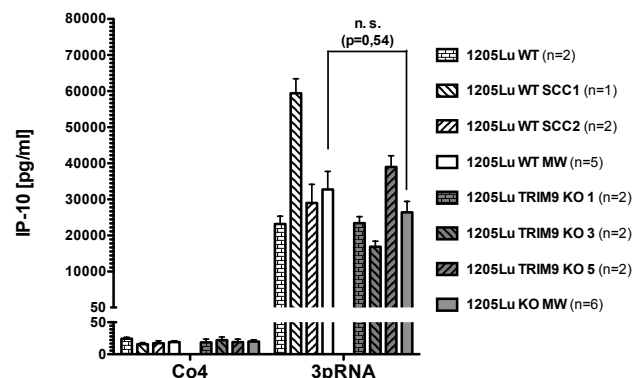


Abbildung 3.4.4: Die TRIM9-Defizienz hat keinen signifikanten Einfluss auf die RIG-I-induzierte Sekretion von IP-10. Drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Dabei wurden als zusätzliche Wildtypkontrollen sowie als Kontrolle der im Rahmen der CRISPR/Cas-Editierung stattgefundenen Einzelzellklonierung zusätzlich zur 1205Lu-WT-Zelllinie die aus dieser durch Einzelzellverdünnung und klonale Expansion etablierten Zelllinien 1205Lu-WT-SSC-1 und 1205Lu-WT-SSC-2 in einige Experimentdurchläufe miteinbezogen. Am folgenden Tag wurden 1000 ng/ml 3pRNA sowie als Kontrolle nicht immunstimulatorische Co4-RNA transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung von IP-10 in den Zellüberständen mittels eines in Triplikaten durchgeführten ELISA. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus der in der Grafik als „n“ angegebenen Anzahl unabhängiger Experimentwiederholungen angegeben. Als „1205Lu WT MW“ sowie „1205Lu KO MW“ ist das *pooling* aller WT-Messwerte beziehungsweise TRIM9-KO-Messwerte dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit dem Student t-Test für den markierten Vergleich bestimmt und ist angegeben als $*=p<0.05$, n.s.=nicht signifikant bei $p>0.5$.

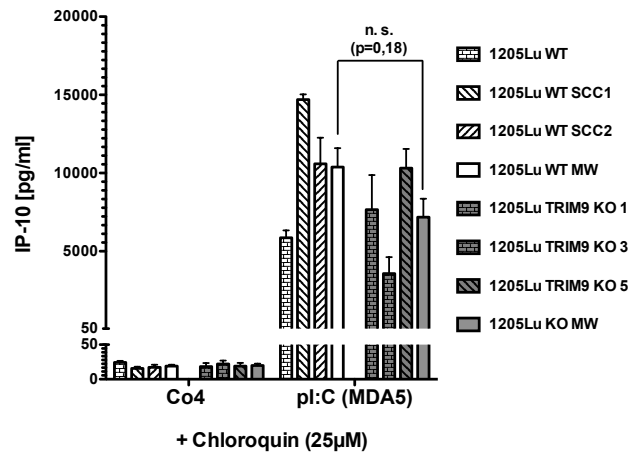


Abbildung 3.4.5: Die TRIM9-Defizienz hat keinen signifikanten Einfluss auf die MDA5-induzierte Sekretion von IP-10. Drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Dabei wurden als zusätzliche Wildtypkontrollen sowie als Kontrolle der im Rahmen der CRISPR/Cas-Editierung stattgefundenen Einzelzellklonierung zusätzlich zur 1205Lu-WT-Zelllinie die aus dieser durch Einzelzellverdünnung und klonale Expansion etablierten Zelllinien 1205Lu-WT-SSC-1 und 1205Lu-WT-SSC-2 miteinbezogen. Am folgenden Tag wurden 20 ng/ml HMW pI:C sowie als Kontrolle nicht immunstimulatorische Co4-RNA transfiziert, nachdem zwei Stunden zuvor das Zellmedium mit 25 μ M Chloroquin versetzt wurde. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung von IP-10 in den Zellüberständen mittels eines in Triplikaten durchgeführten ELISA. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM für alle Messwerte einzeln aus zwei unabhängigen Experimentendurchläufen (**einzeln n=2**) sowie als „1205Lu WT MW“ und „1205Lu KO MW“ als *pooling* aller WT-Messwerte beziehungsweise TRIM9-KO-Messwerte (**MW n=6**) dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit dem Student t-Test für den markierten Vergleich bestimmt und ist angegeben als $*$ = $p<0.05$, n.s.=nicht signifikant bei $p>0.5$.

Zusammenfassend war die kumulative Sekretion von IP-10 (hier als Maß für die Typ-I-Interferon-basierte Immunantwort) innerhalb von 24 Stunden nach Aktivierung von RIG-I und MDA5 zwischen TRIM9-defizienten Zellen und Wildtypzellen nicht als signifikant verschieden zu messen gewesen. Weiterhin wurden die kumulativen Sekretionen von IP-10 und Interleukin-6 zu einem früheren Zeitpunkt nach RLR-Stimulation (nach 18 Stunden) sowie die zu diesem Zeitpunkt hochregulierten Gene Interferon- β , ISG-15, ISG-54 und IP-10 mittels qRT-PCR quantifiziert (siehe Abb. 3.4.7). Dabei zeigte sich nach vier unabhängigen Wiederholungen erneut hinsichtlich der Sekretion von IP-10 kein Unterschied zwischen TRIM9-defizienten Zellen und dem korrespondierenden Wildtyp unter separater Betrachtung dreier TRIM9-defizienter Einzelzellklone (siehe Abb. 3.4.7, A). Auch hinsichtlich der Sekretion von Interleukin-6 zeigte sich kein eindeutiger Phänotyp, der von der TRIM9-Expression abhängig wäre, wobei die verminderte Sekretion nur eines der TRIM9-defizienten Zellklone eher als Nebeneffekt der Einzelzellklonierung interpretiert wird (siehe Abb. 3.4.7, B). Hinsichtlich der mittels qRT-PCR quantifizierten Induktion von Interferon- β , ISG-15, ISG-54 und IP-10 waren mit Ausnahme von ISG-15 ebenso keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von der TRIM9-Expression messbar (siehe Abb. 3.4.7, C-F). Der Effekt einer verstärkten Induktion von ISG-15 in TRIM9-defizienten Zellen ist vor dem Hintergrund deren gesteigerter NF- κ B-Aktivität (siehe Abb. 3.4.2) möglicherweise auf eine verstärkte NF- κ B-Abhängigkeit von ISG-15 zurückzuführen [Desai et al., 2006].

Um in einem letzten Schritt die zeitlich kumulative Induktion und Sekretion von Interferon- β auf direkterem Weg als nur rückschließend über eine Quantifizierung von durch Typ-I-Interferon

induzierbaren Genen zu messen, wurde die Aktivität des Interferon- β -Promotors mittels eines dualen Luciferase-Reporter-*assays* quantifiziert. Es zeigte sich, dass auch hier die zeitlich kumulative Promotoraktivierung innerhalb von 20 bis 24 Stunden nach Aktivierung der RLRs durch ein unterschiedliches TRIM9-Expressionsniveau nicht signifikant beeinflusst wird (siehe Abb. 3.4.6). Dabei wurde sowohl endogenes RIG-I durch 3pRNA als auch das RLR-*downstream-signaling* direkt mittels Kotretransfektion der signalweitergebenden CARD-Domänen von RIG-I und MDA5 aktiviert.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der Aktivierung von RIG-I und MDA5 kein signifikanter Einfluss des TRIM9-Expressionsniveaus auf die resultierende Immunantwort gemessen werden. Auch wenn die Promotorregion des Interferon- β -Gens eine NF- κ B-Bindungsstelle enthält, aufgrund deren Existenz eine gesteigerte Immunantwort TRIM9-defizienter Zellen vor dem Hintergrund einer gesteigerten NF- κ B-Aktivität (siehe Abb. 3.4.2) nahe läge, konnte ein solcher Effekt nicht gemessen werden. Lediglich die Induktion von ISG-15 nach Aktivierung von RIG-I oder MDA5 war für die TRIM9-defizienten Zelllinien signifikant gegenüber dem Wildtyp gesteigert.

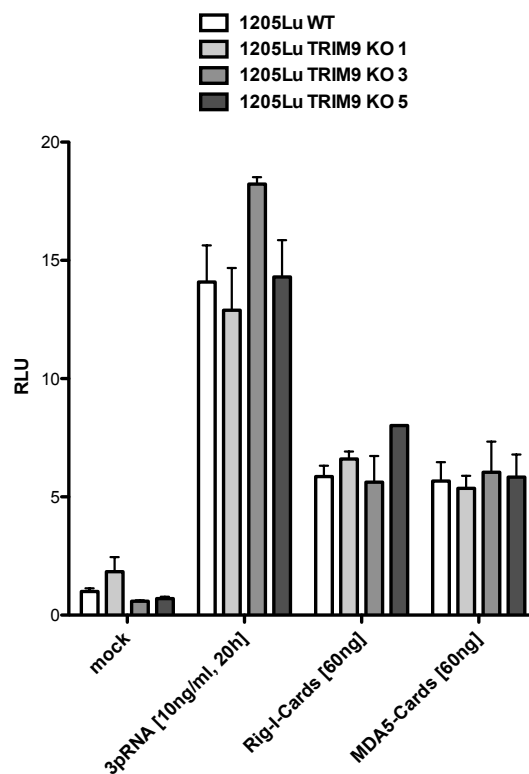


Abbildung 3.4.6: Die TRIM9-Defizienz hat keinen signifikanten Einfluss auf die RIG-I- oder MDA5-induzierte Aktivierung des Interferon- β -Promotors. Drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 30.000 Zellen pro *well* in 96-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion von je 40 ng des „Interferon- β -Reporterplasmids“ und „Renilla-Kontrollplasmids“. Zusätzlich wurde eine Plasmidmenge von 60 ng transfiziert, die entweder einem Leervektor oder Expressionsplasmide kodierend für die RIG-I- oder MDA5-CARD-Domänen enthielt. Vier Stunden nach der Plasmidtransfektion erfolgte die Transfektion von 100 ng/ml 3pRNA in den zugehörigen Stimulationsbedingungen. Nach weiteren 20 Stunden (entsprechend 24 Stunden nach Plasmidtransfektion) wurden die Zellen lysiert und die Aktivität beider Luciferasen wurde nach Substratzugabe mittels Lumineszenz ausgelesen. Das Experiment wurde hinsichtlich aller Messwerte in Triplikaten durchgeführt, jedoch nicht zu unabhängigen Zeitpunkten wiederholt ($n=1$). Die Daten sind als Mittelwerte +SEM auf Basis der Triplikate (hier als methodischer Fehler) als Verhältnis von *Firefly*- zu *Renilla*-Luciferaseaktivität angegeben. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

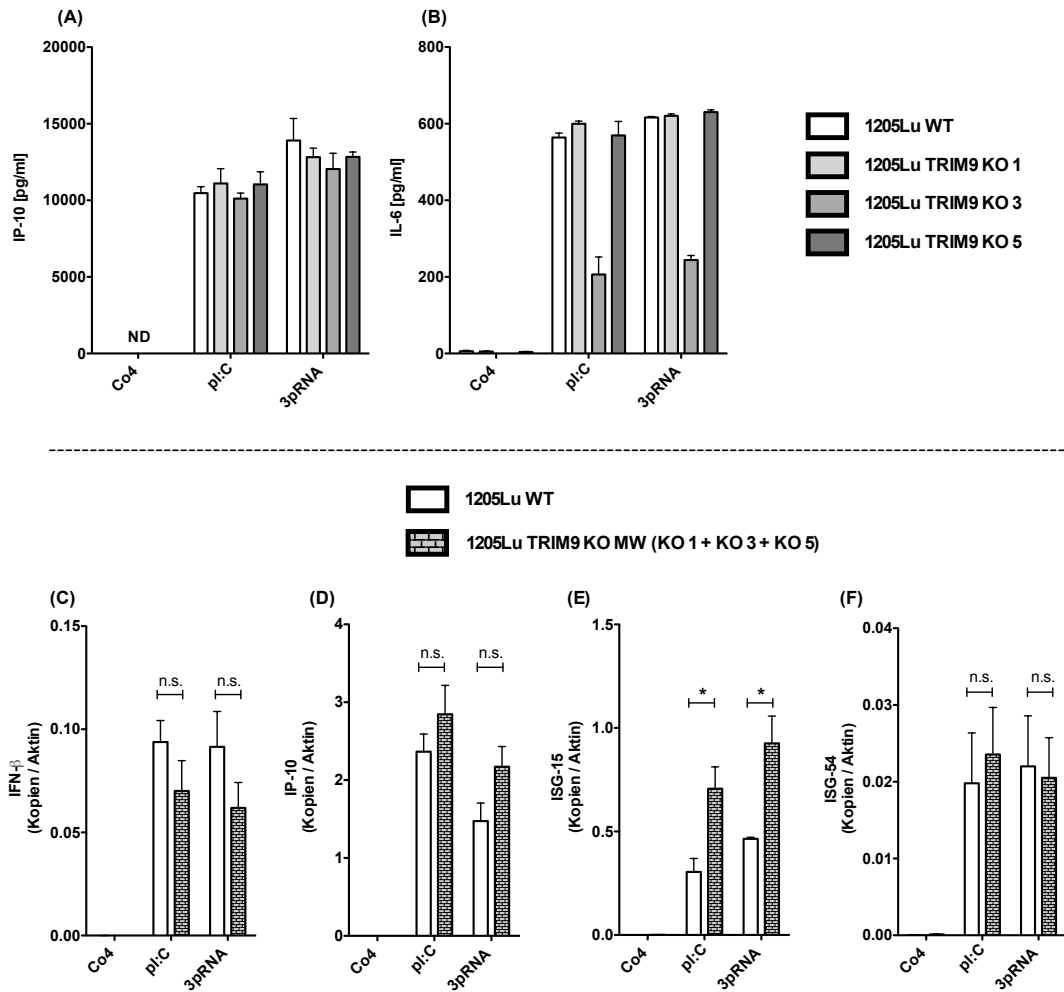


Abbildung 3.4.7: Die TRIM9-Defizienz zeigt abgesehen von einer verstärkten Induktion von ISG-15 keinen signifikanten Einfluss auf die RIG-I- oder MDA5-induzierte Immunantwort. Drei verschiedene 1205Lu-TRIM9-KO-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion von 20 ng/ml HMW pI:C oder 1000 ng/μl 3pRNA sowie als Kontrolle die Transfektion von 20 ng/ml nicht immunstimulatorischer Co4-RNA. Nach einer Stimulationsdauer von 18 Stunden erfolgte die Abnahme der Zellüberstände sowie die RNA-Isolation aus den Zellpellets. Die Konzentrationen von IP-10 und IL-6 in den Zellüberständen wurden mittels ELISA gemessen (A-B). Die Transkriptquantifizierung von IFN-β, ISG-15, ISG-54 und IP-10 erfolgte mittels qRT-PCR und ist relativ zum *Housekeeping*-Gen β-Aktin angegeben (C-F). **(A):** Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus vier (**n=4**) unabhängigen Experimenten angegeben. **(B):** Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus drei beziehungsweise zwei unabhängigen Experimenten für 1205Lu-WT-Zellen beziehungsweise 1205Lu-KO-Zellen (**WT: n=3, KO: n=2**) angegeben. **(C-F):** Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus drei unabhängigen Experimenten für den 1205Lu-WT sowie als Mittelwert aus allen drei TRIM9-KO-Klonen, die jeweils in zwei unabhängige Experimente miteinbezogen wurden, dargestellt (**WT: n=3, KO MW: n=6 bei 3x2**). Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für die markierten Vergleiche bestimmt und sind angegeben als *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, n.s.=nicht signifikant.

3.4.2.2 Die Hemmung der RLR-induzierten Zytokinantwort nach siRNA-*knock-down* von TRIM9 beruht auf einem TRIM9-unabhängigem Nebeneffekt der siRNA

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe haben in der Zelllinie 1205Lu gezeigt, dass der siRNA-vermittelte *knock-down* von TRIM9 zu einer deutlichen Reduktion der Immunantwort nach stimulationsbedingter Aktivierung RIG-I-ähnlicher-Helikasen führt (siehe Abschnitt 1.3.2)¹. Ein solcher Effekt konnte im Rahmen des vorherigen Abschnitts auf Basis des stabilen *knock-outs* von TRIM9 nicht nachvollzogen werden. Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde im Folgenden der siRNA-vermittelte Effekt reproduziert sowie die Kausalität zwischen dem *knock-down* von TRIM9 und der in diesem Rahmen reduzierten Immunantwort näher betrachtet.

In einem ersten Schritt wurde überprüft, ob der beschriebene siRNA-vermittelte Effekt in der Zelllinie 1205Lu reproduzierbar und auf die Zelllinien HEK293 und A549 übertragbar ist. Es zeigte sich zunächst eine Reproduzierbarkeit des bereits bekannten Effektes in der Zelllinie 1205Lu: Die Behandlung mit beiden gegen TRIM9 gerichteten siRNAs führte zu einer Reduktion der Expression von TRIM9 (mRNA-Ebene) auf 25-75 Prozent des Co4-Kontrollniveaus (siehe Abb. 3.4.8, A1). Dabei war die Induktion von Interferon- β und die kumulative Sekretion von IP-10 über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Aktivierung von RIG-I oder MDA5 durch den siRNA-vermittelten *knock-down* von TRIM9 deutlich reduziert (siehe Abb. 3.4.8, A2/A3).

Unter Verwendung desselben experimentellen Protokolls wurde die Reproduzierbarkeit in den Zelllinien HEK293 und A549 getestet: Während in HEK293-Zellen die Effizienz des *knock-downs* von TRIM9 gegenüber jener in 1205Lu-Zellen gesteigert gewesen ist (Reduktion des TRIM9-mRNA-Levels auf circa 25 Prozent des Co4-Kontrollniveaus), zeigte sich in der Zelllinie A549 keine effektive Reduktion des TRIM9-Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene (siehe Abb. 3.4.8, B1/C1). Jedoch stellte sich trotz des effektiven *knock-downs* von TRIM9 in der Zelllinie HEK293 keine reduzierte Induktion von Interferon- β dar, während die kumulative Sekretion von IP-10 im Zuge des *knock-downs* weiterhin deutlich reduziert war (siehe Abb. 3.4.8, B2/B3). In der Zelllinie A549 zeigte sich, dass trotz der ausbleibenden Reduktion von TRIM9 durch die gerichteten siRNAs der Effekt einer reduzierten Sekretion von IP-10 bestehen blieb (siehe Abb. 3.4.8, C1/C3). Damit stellt sich die Frage, ob der *knock-down* von TRIM9 ursächlich für die beobachtete Reduktion der Sekretion von IP-10 ist, oder ob dafür ein Nebeneffekt der transfizierten siRNA verantwortlich ist.

¹Das ursprüngliche Experiment ist unter Verwendung von 1205Lu-WT-Zellen Teil der Promotion von Sofía Antón und wurde im Rahmen dieser Arbeit gemäß desselben Protokolls reproduziert sowie auf die Zelllinien A549 und HEK293 übertragen (siehe Abb. 3.4.8).

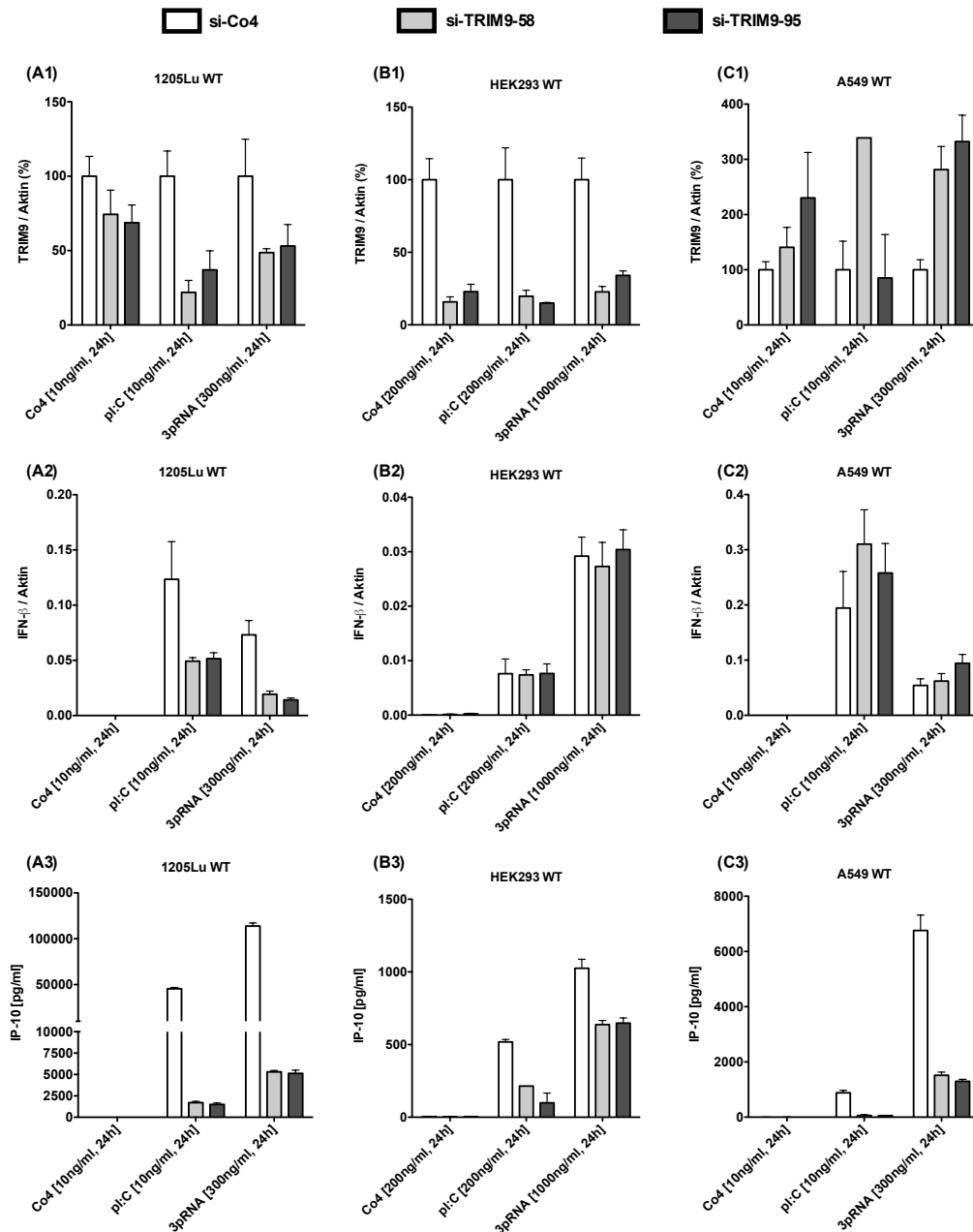


Abbildung 3.4.8: Die Transfektion von gegen TRIM9 gerichteten siRNAs reduziert die pI:C- und 3pRNA-vermittelte Sekretion von IP-10 in den Zelllinien HEK293, 1205Lu und A549. Nach Ausplattieren der Zellen (50.000 A549-WT-Zellen pro *well*, 70.000 HEK293-WT-Zellen pro *well*, 90.000 1205Lu-WT-Zellen pro *well*) im 24-*well*-Format folgte direkt sowie ein zweites Mal nach 24 Stunden die Transfektion von zwei verschiedenen gegen TRIM9 gerichteten siRNAs (si-TRIM9-58 und si-TRIM9-95) beziehungsweise die Transfektion einer nicht gerichteten Kontroll-RNA (Co4) (jeweils 50 nM). Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Stimulation mit transfiziertem pI:C, transfizierter 3pRNA sowie als Kontrolle die Transfektion von Co4 in den angegebenen Mengen. 24 Stunden später wurde der Zellüberstand abgenommen und aus dem Zelllysats die RNA isoliert. Mittels qRT-PCR wurde in der RNA die Expression von TRIM9 (A1/B1/C1) und IFN- β (A2/B2/C2) relativ zum *Housekeeping*-Gen β -Aktin gemessen. In (A1/B1/C1) wurde die Expression von TRIM9 in der Bedingung mit der nicht gerichteten Kontroll-RNA (Co4) auf 100 Prozent gesetzt und die TRIM9-Expression in Anwesenheit der gegen TRIM9 gerichteten siRNAs darauf bezogen. In (A3/B3/C3) wurde die Konzentration von IP-10 im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Alle Daten sind als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) auf Basis der in Triplikaten durchgeführten qRT-PCR sowie des in Triplikaten durchgeführten ELISA angegeben. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

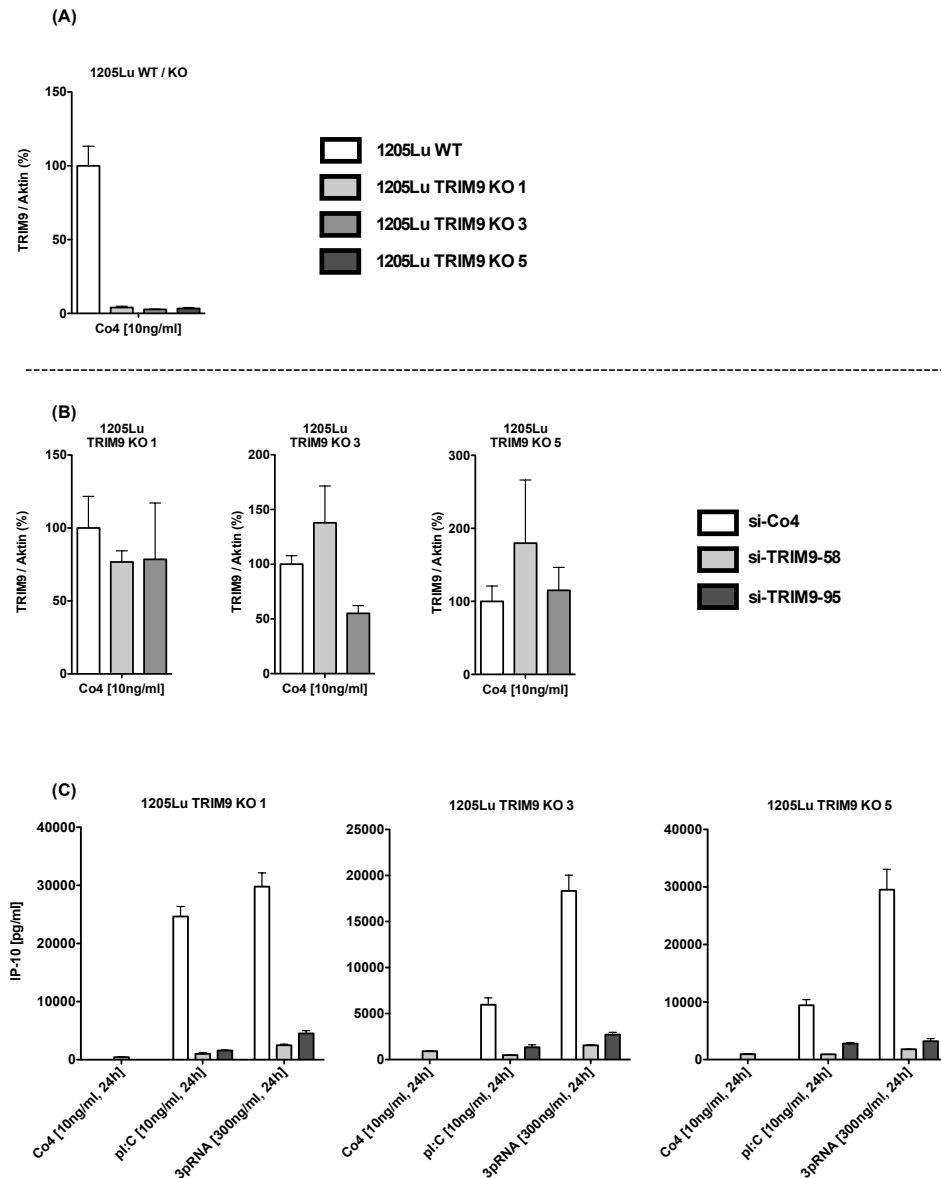


Abbildung 3.4.9: Die Hemmung der RLR-induzierten Zytokinantwort nach siRNA-vermitteltem *knock-down* von TRIM9 beruht auf einem TRIM9-unabhängigen Nebeneffekt der siRNAs. Nach dem Ausplattieren von drei verschiedenen TRIM9-defizienten 1205Lu-Klonen (TRIM9 KO1, KO3, KO5) sowie 1205Lu-WT-Zellen mit je 90.000 Zellen pro *well* im 24-*well*-Format folgte in (B/C) direkt sowie ein zweites Mal nach 24 Stunden die Transfektion von zwei verschiedenen gegen TRIM9 gerichteten siRNAs (si-TRIM9-58 und si-TRIM9-95) beziehungsweise die Transfektion einer nicht gerichteten Kontroll-RNA (Co4) (jeweils 50 nM). Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Stimulation mit transfiziertem pI:C (10 ng/ml), transfizierter 3pRNA (300 ng/ml) sowie als Kontrolle die Transfektion von Co4 (10 ng/ml). 24 Stunden später wurde der Zellüberstand abgenommen und aus dem Zelllysate die RNA isoliert. Mittels qRT-PCR wurde in der RNA die Expression von TRIM9 (A/B) relativ zum *Housekeeping*-Gen β -Aktin gemessen. In (A) wurde die Expression von TRIM9 in der Zelllinie 1205Lu-Wildtyp auf 100 Prozent gesetzt und die TRIM9-Expression der TRIM9-defizienten 1205Lu-Klone darauf bezogen. In (B) wurde die TRIM9-Expression der Bedingung mit der nicht gerichteten Kontroll-RNA (Co4) auf 100 Prozent gesetzt und die TRIM9-Expression in Anwesenheit der gegen TRIM9 gerichteten siRNAs darauf bezogen. In (C) wurde die sezernierte Menge von IP-10 im Zellüberstand mittels ELISA bestimmt. Alle Daten sind als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) auf Basis der in Triplikaten durchgeführten qRT-PCR sowie des in Triplikaten durchgeführten ELISA angegeben. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

Um dies zu überprüfen wurden TRIM9-defiziente 1205Lu-Klone dem gleichen experimentellen Protokoll unterzogen. Im Rahmen dieses Kontrollexperimentes wäre bei gegebener TRIM9-Spezifität des siRNA-vermittelten Effekts kein Einfluss der applizierten siRNAs auf die pI:C- und 3pRNA-induzierte Sekretion von IP-10 zu erwarten, da TRIM9 zum einen bereits deletiert ist und in den verwendeten 1205Lu-TRIM9-KO-Klonen ebenso die TRIM9-mRNA-Expression bereits auf zwei bis fünf Prozent des Wildtypniveaus reduziert ist (siehe Abb. 3.4.9, A und Abb. 3.2.2). Es zeigte sich erwartungsgemäß, dass die Behandlung der 1205Lu-TRIM9-KO-Klone mit den gegen die TRIM9-mRNA gerichteten siRNAs das bereits reduzierte mRNA-Expressionsniveau von TRIM9 nicht weiter effektiv reduziert (siehe Abb. 3.4.9, B). Nichtsdestotrotz blieb unerwarteterweise der Effekt einer reduzierten, zeitlich kumulativen Sekretion von IP-10 im Rahmen der siRNA-Applikation für alle TRIM9-defizienten 1205Lu-Klone weiterhin bestehen (siehe Abb. 3.4.9, C).

Damit konnte in den Zelllinien 1205Lu, HEK293 und A549 zusammenfassend gezeigt werden, dass die Transfektion der TRIM9-siRNAs zu einer deutlichen Reduktion der pI:C- und 3pRNA-vermittelten Sekretion von IP-10 führt, dieser Effekt jedoch nicht ursächlich durch den *knock-down* von TRIM9, sondern mutmaßlich durch einen unspezifischen Nebeneffekt der verwendeten siRNAs bedingt ist.

3.4.3 Kein Einfluss der TRIM9-Expression auf die Interferon- β -induzierte Sekretion von IP-10

Nach Versteeg et al. wurde der Effekt einer gesteigerten ISRE-Promotoraktivität im Rahmen einer transienten Überexpression von TRIM9 beschrieben [Versteeg et al., 2013]. Dieser Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit in der Zelllinie HEK293 reproduziert werden: Die transiente Überexpression von TRIM9 führte ohne weiteren Stimulus zu einer Aktivierung des ISRE-Promotors, während die Aktivität des Interferon- β -Promotors von der transienten Überexpression unbeeinflusst blieb (siehe Abb. 3.4.10, A). Darüber hinaus konnte in der Zelllinie A549 demonstriert werden, dass auch Zellen mit stabiler TRIM9-Überexpression sowie TRIM9-defiziente Zellen einen damit konsistenten Effekt auf die Interferon- β -induzierte ISRE-Aktivität haben: Die Expression von TRIM9 scheint innerhalb des Reporterassays - wenn auch unter der angegebenen Anzahl von Wiederholungen noch nicht signifikant - die Aktivierung des ISRE-Promotors zu fördern (siehe Abb. 3.4.10, B).

Daraufhin wurde untersucht, ob dieses ein artifizieller Effekt des Reporter-*assays* ist oder ebenso die Induktion endogener ISGs durch das Expressionsniveau von TRIM9 beeinflusst wird. Vor diesem Hintergrund wurde der JAK-/STAT-Signalweg erneut durch Stimulation mit rekombinantem Interferon- β aktiviert und die kumulative Sekretion von IP-10 innerhalb von 24 Stunden mittels ELISA quantifiziert. Dabei war in der Zelllinie 1205Lu kein signifikanter Unterschied zwischen TRIM9-defizienten Zellen und den korrespondierenden Wildtypzellen bei deutlichen Einzelklonschwankungen zu messen (siehe Abb. 3.4.11). Ebenso die im Zeitverlauf quantifizierten Interferon- β -induzierten Hochregulationen von ISG-15 (siehe Abb. 3.4.14, D) sowie ISG-54 (hier nicht dargestellt) stellten sich von der TRIM9-Defizienz als nicht wesentlich beeinflusst dar und waren nicht konsistent mit einer gemäß Abb. 3.4.10 zu erwartenden, verminderten ISG-Induktion TRIM9-defizienter Zellen.

Zusammenfassend konnte im Rahmen von Reporter-*assays* demonstriert werden, dass TRIM9 - dabei vor allem im Rahmen einer transienten Überexpression - die Aktivität des ISRE-Promotors fördert. Jedoch zeigte sich dieser Effekt nicht im Experiment, das den Einfluss von TRIM9 auf durch Interferon- β induzierte, endogene ISGs untersuchte: Die Sekretion von IP-10 sowie die Hochregulation von ISG-15 und ISG-54 stellten sich als von der TRIM9-Defizienz nicht signifikant beeinflusst dar.

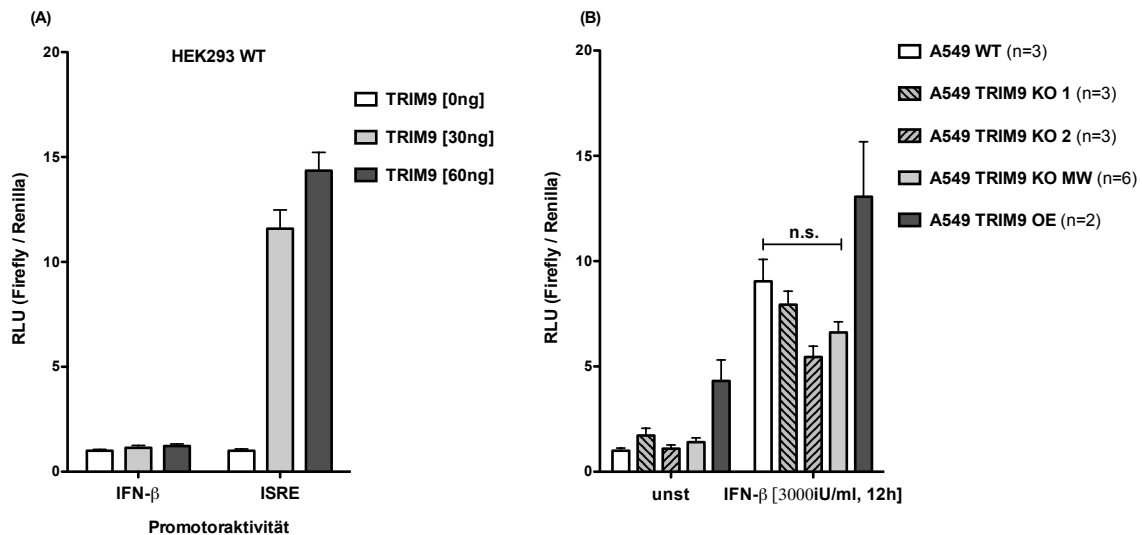


Abbildung 3.4.10: TRIM9 fördert die Aktivierung des ISRE-Promotors. Nach Ausplattieren von 25.000 HEK293-WT-Zellen pro *well* (A) beziehungsweise von 20.000 A549-WT-Zellen pro *well*, von 20.000 Zellen zweier TRIM9-defizienter A549-Klone pro *well* sowie von 20.000 Zellen eines stabil TRIM9-überexprimierenden A549-Klons pro *well* (B) im 96-*well*-Format erfolgte am nächsten Tag die Transfektion der Reporter- und Expressionsplasmide (40 ng pro *well* eines ISRE-*Firefly*-Reporterplasmids (A/B) oder IFN- β -*Firefly*-Reporterplasmids (A) in Kombination mit 40 ng eines *Renilla*-Kontrollplasmids, aufgefüllt mit einem Leervektor beziehungsweise TRIM9-Expressionsplasmid (A) auf insgesamt 140 ng Plasmidmenge). Die Zugabe von Interferon- β zum Zellmedium in (B) erfolgte 6 Stunden nach der Transfektion. Nach weiteren 12 Stunden - der Zeitpunkt entspricht 18 Stunden nach der Plasmidtransfektion - wurden die Zellen lysiert und die Aktivität beider Luciferasen mittels Lumineszenz ausgelesen. Die Darstellung der Daten erfolgte als Verhältnis von *Firefly*- zu *Renilla*-Luciferase-Aktivität (RLU). (A): Die Daten sind als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) auf Basis des in Triplikaten durchgeführten Experimentes angegeben, n=1. (B): Die Daten sind als Mittelwerte +SEM (hier als biologischer Fehler) aus der in (B) grafisch angegebenen Anzahl unabhängiger Experimente für die Klone einzeln sowie zusätzlich als *pooling* beider TRIM9-defizienter Klone als „A549 TRIM9 KO MW“ dargestellt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Student t-Test und ist für den markierten Vergleich angegeben mit *= $p < 0.05$, n.s.=nicht signifikant bei $p > 0.05$.

3.4.4 Gesteigerte TLR3-induzierte Zytokinantwort in TRIM9-defizienten Zellen

Um neben den Signalwegen RIG-I-ähnlicher-Rezeptoren und neben dem JAK-/STAT-Signalweg im Rahmen von Interferonstimulationen mögliche Einflüsse des TRIM9-Expressionsniveaus auf den TLR3-Signalweg zu prüfen, erfolgte die Aktivierung von TLR3 mittels nicht transfiziertem HMW pI:C. In Vorexperimenten konnte bereits demonstriert werden, dass die so resultierende Immunantwort durch vorherige Zugabe von Chloroquin zum Zellmedium vollständig geblockt werden kann (siehe Abb. 3.1.2). Dies argumentiert für eine weitgehende TLR3-Spezifität der verwendeten Stimulationskondition.

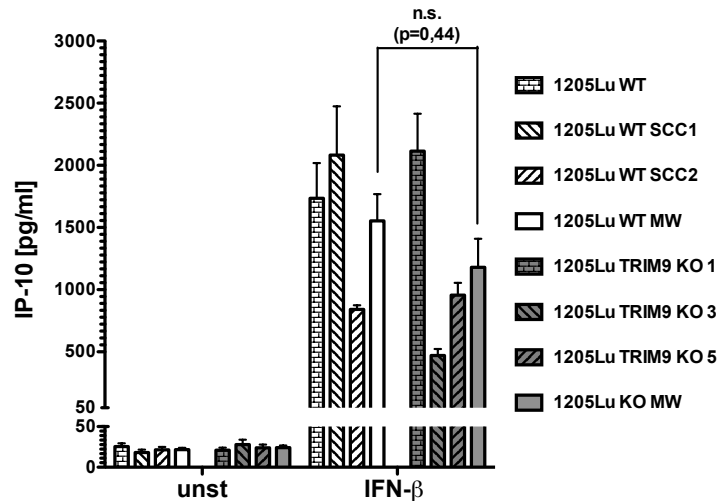


Abbildung 3.4.11: Die TRIM9-Defizienz hat keinen signifikanten Einfluss auf die Interferon- β -induzierte Sekretion von IP-10. Drei verschiedene TRIM9-defiziente 1205Lu-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Dabei wurden als zusätzliche Wildtypkontrollen sowie als Kontrolle der im Rahmen der CRISPR/Cas-Editierung stattgefundenen Einzelzellklonierung ergänzend zur 1205Lu-WT-Zelllinie die aus dieser durch Einzelzellverdünnung und klonale Expansion etablierten Zelllinien 1205Lu-WT-SSC-1 und 1205Lu-WT-SSC-2 mit einbezogen. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium mit rekombinantem Interferon- β (5000 iU/ml) versetzt. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung von IP-10 in den Zellüberständen mittels eines in Triplikaten durchgeführten ELISA. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus zwei unabhängigen Experimenten für die Zelllinien einzeln (**einzel** $n=2$) sowie als „1205Lu WT MW“ und „1205Lu TRIM9 KO MW“ als *pooling* aller WT-Messwerte beziehungsweise TRIM9-KO-Messwerte (**MW** $n=6$) dargestellt. Die Signifikanzanalyse erfolgte mit dem Student t-Test und ist für den markierten Vergleich angegeben mit $*$ = $p<0.05$, n.s.=nicht signifikant bei $p>0.05$.

Hinsichtlich der kumulativen IP-10-Sekretion über 24 Stunden nach Aktivierung von TLR3 ließ sich ein Effekt der TRIM9-Defizienz in der Zelllinie 1205Lu feststellen: Der Verlust von TRIM9 scheint die TLR3-induzierte Sekretion von IP-10 signifikant zu steigern (siehe Abb. 3.4.12). Ebenso konnte im Zeitverlauf nach Aktivierung von TLR3 eine im Rahmen der TRIM9-Defizienz gesteigerte Induktion von Interferon- β sowie ISG-54 demonstriert werden (siehe Abb. 3.4.13). Ein ähnlicher Effekt bezüglich der Induktion von ISG-15 ist in Abb. 3.4.14 dargestellt. Zwar konnten einerseits signifikante Effekte bezüglich der Sekretion von IP-10 demonstriert werden, es ist jedoch andererseits kritisch auf die Einzelklonschwankungen sowohl innerhalb der Wildtypgruppe als auch der Gruppe TRIM9-defizienter Zelllinien hinzuweisen. Ein Großteil der im Zeitverlauf gesteigerten Induktion von ISGs in TRIM9-defizienten Zellen (hier auf Basis eines Zellgemisches verschiedener TRIM9-KO-Klone) könnte daher ebenso durch einen einzelnen Zellklon bedingt sein. Des Weiteren ist es nicht gelungen, dem Verlust von TRIM9 entgegengesetzte Effekte durch eine transiente Überexpression von TRIM9 zu erzielen.

Zusammenfassend war nach Aktivierung von TLR3 eine im Rahmen der TRIM9-Defizienz gesteigerte Immunantwort zu beobachten. Dabei konnte sowohl eine Steigerung der Sekretion von IP-10 als auch eine verstärkte Induktion von Interferon- β , ISG-54 sowie ISG-15 gemessen werden.

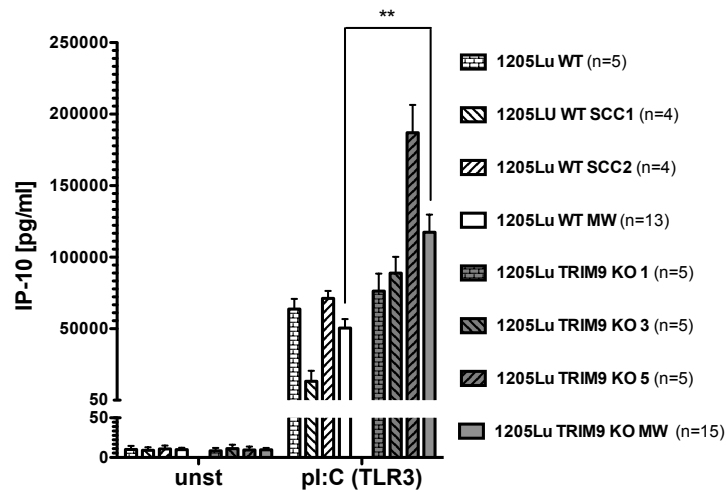


Abbildung 3.4.12: Die TLR3-vermittelte Sekretion von IP-10 ist in TRIM9-defizienten Zellen verstärkt. Drei verschiedene TRIM9-defiziente 1205Lu-Klone sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Dabei wurden als zusätzliche Wildtypkontrollen sowie als Kontrolle der im Rahmen der CRISPR/Cas-Editierung stattgefundenen Einzelzellklonierung zusätzlich zur 1205Lu-WT-Zelllinie die aus dieser durch Einzelzellverdünnung und klonale Expansion etablierten Zelllinien 1205Lu-WT-SSC-1 und 1205Lu-WT-SSC-2 in einige Experimentdurchläufe miteinbezogen. Am folgenden Tag wurde das Zellmedium mit 3 µg/ml HMW pI:C versetzt. Nach 24 Stunden erfolgte die Messung von IP-10 in den Zellüberständen mittels eines in Triplikaten durchgeführten ELISA. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM aus der in der Grafik als „n“ angegebenen Anzahl unabhängiger Experimentwiederholungen angegeben. Als „1205Lu WT MW“ sowie „1205Lu TRIM9 KO MW“ ist das *pooling* aller WT-Messwerte beziehungsweise TRIM9-KO-Messwerte dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit dem Student t-Test für den markierten Vergleich bestimmt und ist angegeben als *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$.

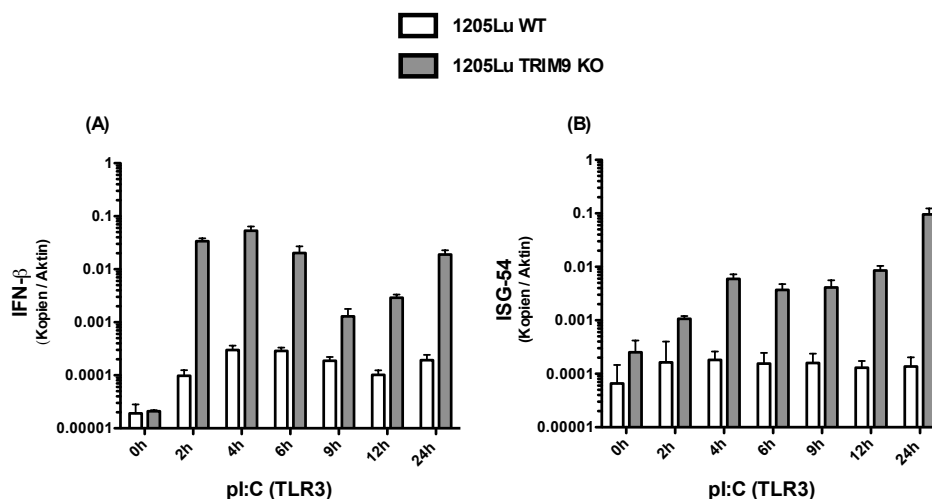


Abbildung 3.4.13: Die TRIM9-Defizienz steigert die TLR3-vermittelte Induktion von Interferon-β sowie ISG-54 nach Stimulation mit HMW pI:C. Ein Zellgemisch bestehend aus gleichen Anteilen dreier TRIM9-defizienter 1205Lu-Klone (1205Lu-TRIM9-KO-Klone 1/3/5) sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit je 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Zugabe von 3 µg/ml HMW pI:C zum vorbestehenden Medium. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Expression von Interferon-β sowie ISG-54 wurde nach RNA-Isolation mittels qRT-PCR relativ zum *Housekeeping*-Gen β-Aktin quantifiziert. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt; angegeben sind Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler). Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

3.4.5 Gesteigerte Induktion von ISG-15 in TRIM9-defizienten Zellen

In Abschnitt 3.4.2.2 stellte sich der in Vorarbeiten beschriebene Effekt einer generell verminderten RLR-induzierten Immunantwort durch den *knock-down* von TRIM9 als unspezifisch heraus. Für den stabilen *knock-out* von TRIM9 konnte darüber hinaus kein genereller Effekt auf die Immunantwort demonstriert werden - lediglich die RLR-vermittelte Induktion von ISG-15 stellte sich in TRIM9-defizienten Zellen als signifikant gesteigert heraus (siehe Abb. 3.4.7). Um diesen Effekt weiter zu untersuchen, erfolgte die Messung der Induktion von ISG-15 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aktivierung des RLR-, JAK-STAT- oder TLR-Signalweges: Neben der RIG-I- und MDA5-vermittelten Induktion von ISG-15 wurde diese auch nach Aktivierung von TLR3 sowie nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- β in An- und Abwesenheit von TRIM9 charakterisiert.

Unter allen Stimulationskonditionen war eine deutliche Hochregulation von ISG-15 zu beobachten, die nach Applikation von rekombinantem Interferon- β erwartungsgemäß früher einsetzte als nach Aktivierung der vorgeschalteten Signalwege von RIG-I, MDA5 sowie TLR3. Darüber hinaus zeigte sich nach Aktivierung von RIG-I, MDA5 sowie TLR3 der Effekt einer verstärkten Induktion von ISG-15 in TRIM9-defizienten Zellen, wie dies bereits in Abbildung 3.4.7 für einen singulären Zeitpunkt gezeigt werden konnte (siehe Abb. 3.4.14, A-C). Die Induktion von ISG-15 im Rahmen der Stimulation mit rekombinantem Interferon- β zeigte in Abhängigkeit der TRIM9-Expression keine deutlichen Unterschiede (siehe Abb. 3.4.14, D).

Die Abhängigkeit der Induktion von ISG-15 von der TRIM9-Expression fiel nach Aktivierung von TLR3 am deutlichsten aus (siehe Abb. 3.4.14, C). Dies ist konsistent mit vorherigen Experimenten, in denen die Aktivierung von TLR3 die ausgeprägtesten Effekte der TRIM9-Defizienz auf die resultierende Immunantwort hervorbrachte. Denkbar ist, dass sich Effekte umso stärker darstellen je ausgeprägter die Aktivierung von NF- κ B in das jeweilige *downstream-signaling* des Rezeptors eingebunden ist: Der Wegfall der inhibitorischen Wirkung von TRIM9 auf die Aktivierung von NF- κ B - wie nach Shi et al. publiziert und in Abschnitt 3.4.1 für die hier verwendeten Expressionsmodelle validiert - wäre konsistent mit einer höheren Induktion entsprechend regulierter Zytokine [Shi et al., 2014]. Inwieweit die verstärkte Induktion von ISG-15 als Sekundäreffekt eines beeinflussten Aktivitätsniveaus von NF- κ B zu betrachten ist, muss in weiteren Studien untersucht werden.

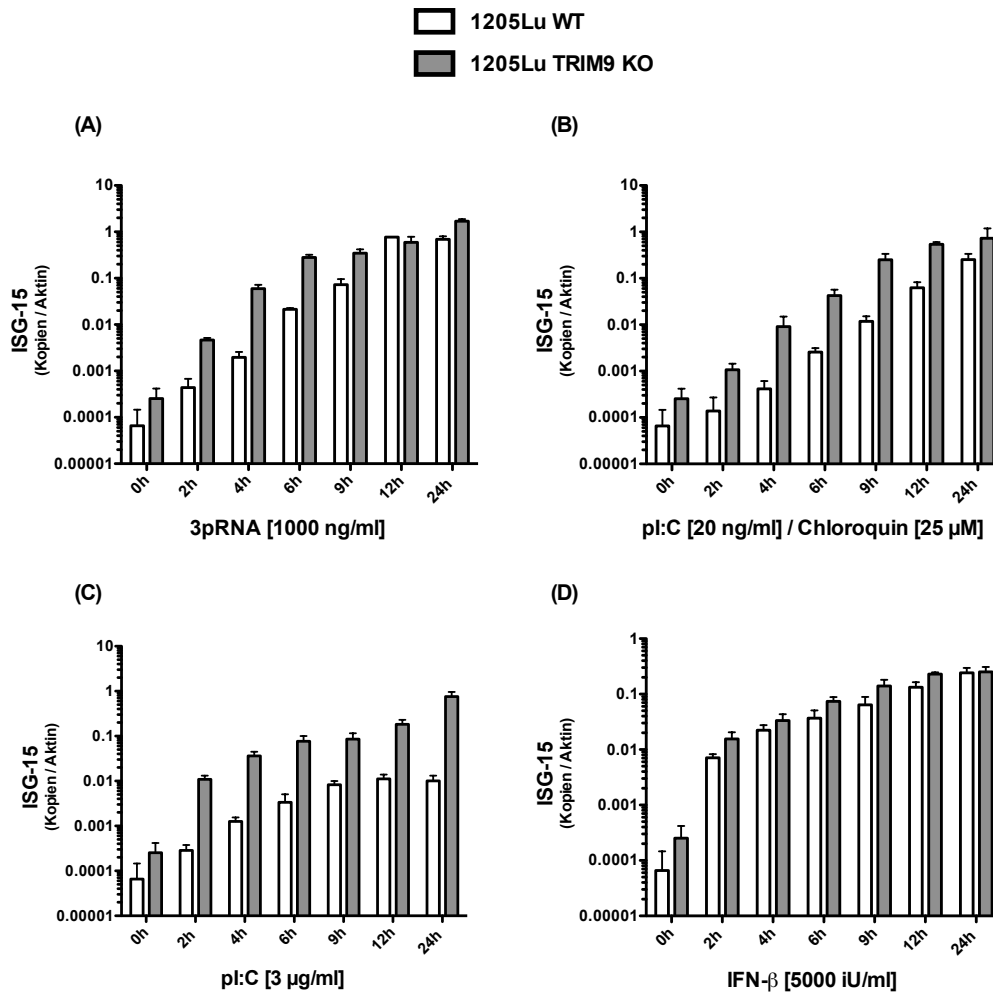


Abbildung 3.4.14: Die TRIM9-Defizienz steigert die Induktion von ISG-15 nach Stimulation von RIG-I, MDA5 sowie TLR3 in den ersten Stunden nach Stimulation. Ein Zellgemisch bestehend aus gleichen Anteilen dreier TRIM9-defizienter 1205Lu-Klone (1205Lu-TRIM9-KO-Klone 1/3/5) sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit je 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplatziert. Am nächsten Tag erfolgte die Aktivierung von RIG-I (A: Transfektion von 1000 ng/ml 3pRNA), MDA5 (B: Transfektion von 20 ng/ml pI:C zwei Stunden nach Zugabe von 25 µM Chloroquin ins Zellmedium), TLR3 (C: Zugabe von 3 µg/ml pI:C ins Zellmedium) sowie die Stimulation mit rekombinantem Interferon-β (D: 5000 iU/ml IFN-β). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die Expression von ISG-15 wurde nach RNA-Isolation mittels qRT-PCR relativ zum *Housekeeping*-Gen β -Aktin quantifiziert. Die qRT-PCR wurde in Triplikaten durchgeführt; angegeben sind Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler). Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

3.5 Rekonstitutionsversuche der durch die TRIM9-Defizienz supprimierten Virusreplikation

Abschnittsüberblick	Seite
3.5.1 Inhibition von NF- κ B durch ACHP	97
3.5.2 Inhibition von TLRs durch Chloroquin	99
3.5.3 Inhibition des Golgi-Apparates durch Monensin	101

In den vorherigen Kapiteln konnte für alle getesteten, replikationskompetenten Viren eine durch den Verlust von TRIM9 bedingte Inhibition der Virusreplikation demonstriert werden, die für alle (+)ssRNA-Viren mit einer gesteigerten Sekretion von IP-10 sowie für VSV mit einer generalisiert verminderten Immunantwort einherging. In diesem Kapitel werden als Annäherung an den ursächlichen Molekularmechanismus Inhibitoren getestet, mit der Frage, ob sie den Effekt der durch die TRIM9-Defizienz supprimierten Virusreplikation (hier fokussierend auf VSV) revertieren können.

3.5.1 Inhibition von NF- κ B durch ACHP

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob die mit der TRIM9-Defizienz verbundene, gesteigerte Aktivierung von NF- κ B und die supprimierte Virusreplikation zusammenhängen. Zu diesem Zweck wurde während einer Infektion mit VSV-M51R durch den Inhibitor ACHP die Aktivierung von NF- κ B blockiert und es wurde der Effekt der NF- κ B-Blockade auf die TRIM9-Defizienz-vermittelte Replikationsinhibition gemessen. Dabei wirkt ACHP als I κ B-Kinase-Inhibitor (im Speziellen als Inhibitor von IKK α und IKK β) sowie als Inhibitor der DNA-Bindung von NF- κ B [Sanda et al., 2005].

Es konnte zunächst mittels dualer Luciferase-*assays* gezeigt werden, dass ACHP ab einer Konzentration von 10 ng/ml die Aktivierung von NF- κ B vermindert und ab einer Konzentration von 1 μ g/ml die PMA-, TNF- α - sowie VSV-M51R-induzierte Aktivierung von NF- κ B nahezu vollständig unterdrückt (siehe Abb. 3.5.1, B). Die Erhöhung der Dosierung von ACHP auf 10 μ g/ml hatte darüber hinaus zytopathische Effekte, was sich in einer verminderten Expression der transfizierten Kontroll-Luciferase (*Renilla*) widerspiegelt (siehe Abb. 3.5.1, A).

Unter ACHP in aufsteigenden Konzentrationen im Zellmedium war eine partielle Rekonstitution der durch den Verlust von TRIM9 vermittelten Replikationshemmung zu messen: Der Unterschied zwischen 1205Lu-WT-Zellen und TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen hinsichtlich der Replikation von VSV-M51R nahm mit aufsteigenden Konzentrationen von ACHP ab (siehe Abb. 3.5.1, D). Darüber hinaus wurde die Sekretion von IP-10 in den Zellüberstand durch ACHP supprimiert (siehe Abb. 3.5.1, C).

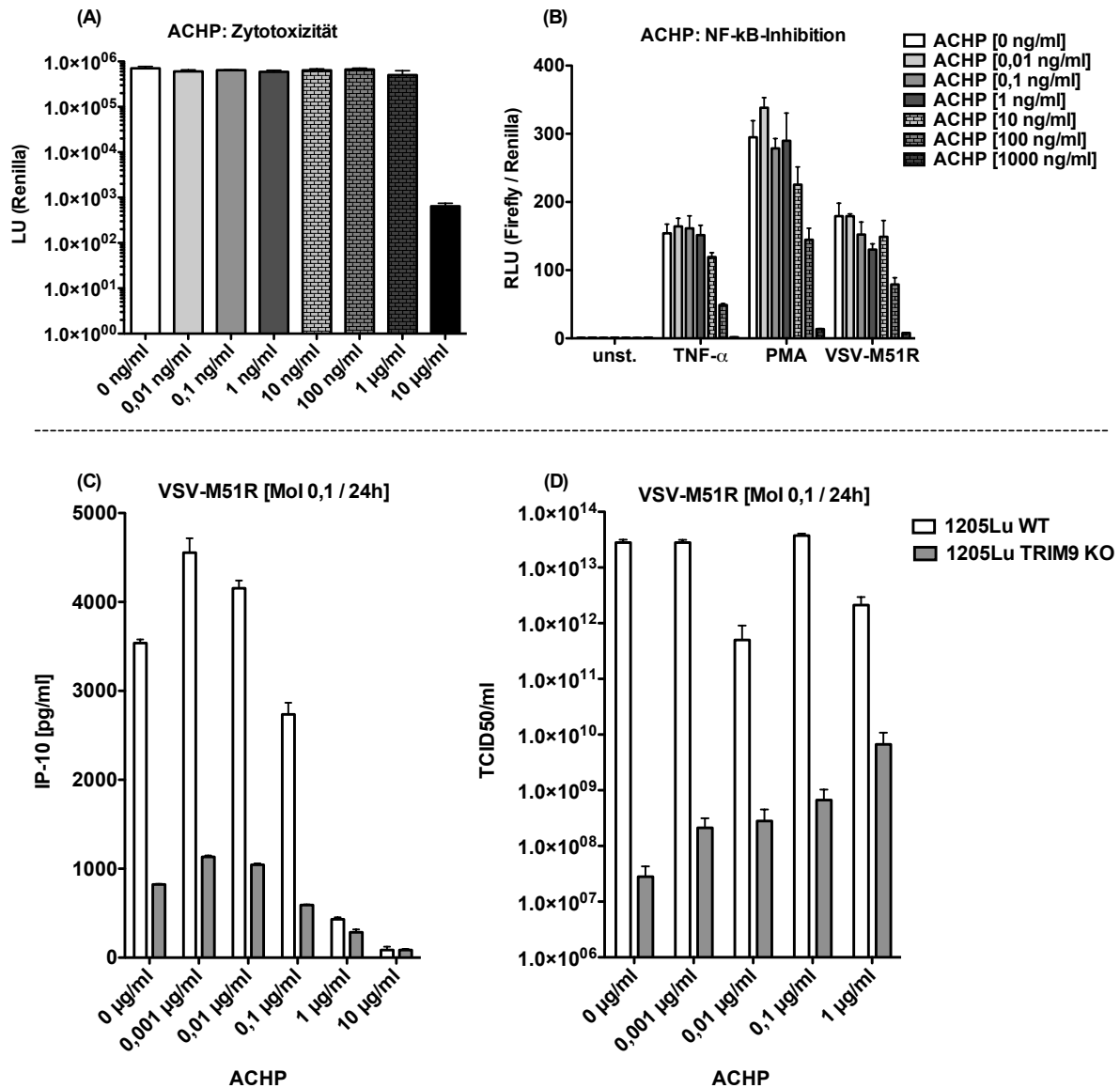


Abbildung 3.5.1: Die Blockade von NF- κ B durch ACHP führt zur partiellen Rekonstitution der durch die TRIM9-Defizienz verursachten Replikationshemmung von VSV. (A/B): 25.000 HEK293*-WT-Zellen¹ wurden pro *well* in 96-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte pro *well* die Transfektion von je 40 ng des „3x-NF- κ B-*Firefly*-Reporterplasmids“ und „*Renilla*-Kontrollplasmids“. Sechs Stunden später erfolgte die Zugabe von TNF- α (10 ng/ml) oder PMA (100 ng/ml) oder VSV-M51R (MoI 1) jeweils in Kombination mit den angegebenen, aufsteigenden Mengen von ACHP zum Zellmedium. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die Aktivität beider Luciferasen wurde nach Substratzugabe mittels Lumineszenz ausgelesen. Das Experiment wurde hinsichtlich aller Messwerte in Triplikaten durchgeführt, jedoch nicht zu unabhängigen Zeitpunkten wiederholt ($n=1$). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM auf Basis der Triplikate (hier als methodischer Fehler) als Verhältnis von *Firefly*- zu *Renilla*-Luciferaseaktivität (B) sowie separat als Aktivität der *Renilla*-Luciferase (A) angegeben. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht. **(C/D):** Ein Zellgemisch bestehend aus gleichen Anteilen dreier TRIM9-defizienter 1205Lu-Klone (1205Lu-TRIM9-KO-Klone 1/3/5) sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit je 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Zellmedium mit den angegebenen Mengen von ACHP sowie im Rahmen der Virusinfektion mit VSV-M51R (MoI 0,1) versetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellüberstände abgenommen und die Konzentrationen von IP-10 wurden mittels ELISA (C) gemessen. Die Virustiter in den Zellüberständen wurden mittels TCID₅₀-assays gemessen (D). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (hier als methodischer Fehler) auf Basis des in Triplikaten durchgeführten ELISA (C) sowie des in acht Replikaten durchgeführten TCID₅₀-assays (D) dargestellt. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

Es kann damit zusammenfassend zwar keine Aussage darüber getroffen werden, ob es sich bei der durch die TRIM9-Defizienz vermittelten Inhibition der Virusreplikation ausschließlich um eine Folge der TRIM9-vermittelten Suppression von NF- κ B handelt. Jedoch konnte zumindest ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen gezeigt werden.

3.5.2 Inhibition von TLRs durch Chloroquin

Weiterhin kommt die Möglichkeit in Betracht, dass der Einfluss von TRIM9 auf die Virusreplikation mit affektierten Signalwegen von endosomal lokalisierten TLRs zusammenhängt. Dabei kommen neben TLR13 und TLR9 in erster Linie TLR3, TLR7 und TLR8 in Betracht, deren Liganden RNA-Moleküle sind. Endosomale TLRs können durch Chloroquin, welches in Endo- und Lysosomen akkumuliert und das dortige Milieu alkalisiert, effektiv inhibiert werden. In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob die Applikation von Chloroquin den Einfluss des TRIM9-Expressionsniveaus auf die Virusreplikation aufhebt.

Es zeigte sich zunächst, dass Chloroquin-Konzentrationen bis zu 10 μ M in den verwendeten Zellen grundsätzlich eine Replikation der Viren VSV-M51R und EMCV zulassen, während unter einer Chloroquin-Konzentration von 100 μ M sowohl lichtmikroskopisch Zytotoxizität als auch mittels TCID₅₀-*assay* ein Verlust der Replikationskompetenz zu beobachten war (siehe Abb. 3.5.2, A/B). Dass die Blockade von TLR3 funktionell war, zeigte sich daran, dass die Zugabe von Chloroquin die TLR3-vermittelte Sekretion von IP-10 deutlich reduzierte. Dabei waren TRIM9-defiziente Zellen weniger empfindlich gegenüber Chloroquin als Wildtypzellen (Daten nicht gezeigt). Im Bereich von Chloroquin-Konzentrationen bis zu 10 μ M zeigte sich weiterhin, insbesondere für VSV-M51R, ein antiviraler Effekt von Chloroquin, der konsistent zur publizierten Literatur ist und mutmaßlich auf pH-abhängige Teile der Virusreplikation sowie immunmodulatorische Effekte zurückzuführen ist [Savarino et al., 2003; Vincent et al., 2005]. So ist grundsätzlich jede Interaktion von Viren mit Wirtszellproteinen als potentiell pH-abhängig anzusehen, wovon unter anderem die endozytotische Aufnahme von Viren sowie im Fall von Chloroquin unter anderem die Interaktion von Viren mit endolysosomalen Membranen im Rahmen des *buddings* oder des *release* aus Endozytosevesikeln affektiert sein können [Savarino et al., 2003; Yang et al., 2004]. Mit der Chloroquin-vermittelten Replikationssuppression ging insbesondere für Konzentrationen von 10 μ M bei noch stattfindender Virusreplikation ein nahezu kompletter Verlust der Sekretion von IP-10 einher (siehe Abb. 3.5.2, C). Es ist vor diesem Hintergrund davon auszugehen, dass ein Großteil der VSV-M51R-induzierten Sekretion von IP-10 über endosomale TLRs vermittelt wird.

Es konnten zusammenfassend zwar antivirale Effekte von Chloroquin demonstriert werden, jedoch war der Einfluss von TRIM9 auf die Replikation von VSV-M51R sowie EMCV durch Chloroquin nicht aufzuheben gewesen. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass der zugrunde liegende Wirkmechanismus von TRIM9, der die Virusreplikation messbar beeinflusst, nicht über die Signalwege von endosomal lokalisierten TLRs vermittelt wird.

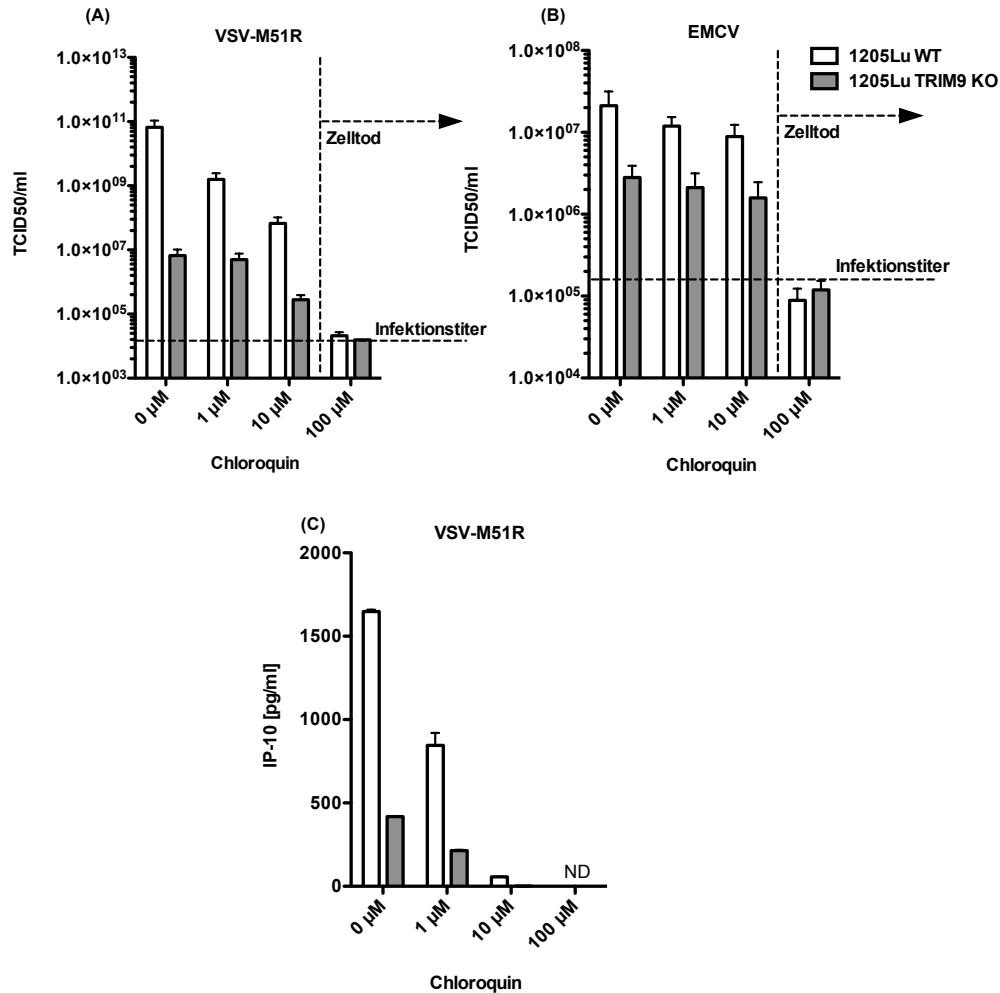


Abbildung 3.5.2: Die Inhibition von TLRs durch Chloroquin zeigt antivirale Effekte, hebt jedoch den Effekt der TRIM9-Defizienz auf die Virusreplikation nicht auf. Ein Zellgemisch bestehend aus gleichen Anteilen dreier TRIM9-defizienter 1205Lu-Klone (1205Lu-TRIM9-KO-Klone 1/3/5) sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit je 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplatziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von VSV-M51R (MoI 0,1) oder EMCV (MoI 1) jeweils in Kombination mit den angegebenen, aufsteigenden Mengen von Chloroquin zum Zellmedium. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellüberstände abgenommen und die Konzentrationen von IP-10 wurden mittels ELISA (C) gemessen (ND=unterhalb der Nachweisgrenze). Die Virustiter in den Zellüberständen wurden mittels TCID50-*assays* gemessen (A/B). In (A/B) sind mit gestrichelten Linien die zur Infektion verwendeten Virustiter sowie die Konzentrationen von Chloroquin dargestellt, ab der lichtmikroskopisch zytopathische Effekte durch das vermehrte Absterben von Zellen zu beobachten waren. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) auf Basis des in Triplikaten durchgeführten ELISA (C) sowie der in acht Replikaten durchgeführten TCID50-*assays* (A/B) dargestellt. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

3.5.3 Inhibition des Golgi-Apparates durch Monensin

In einem weiteren Versuch die durch die TRIM9-Defizienz vermittelte Replikationsinhibition aufzuheben wurde der Golgi-Apparat durch Monensin blockiert. Dabei blockiert Monensin den Proteintransport durch den Golgi-Apparat sowie die Glykosilierung von Proteinseitenketten [Rosa et al., 1992; Tartakoff et al., 1978; Tartakoff, 1983]. Im Zusammenhang mit Virusreplikation ist beschrieben, dass Monensin den intrazellulären Transport viraler Glykoproteine (*Semliki-forest-Virus*, *Sindbis-Virus*, *VSV*) zur Zellmembran inhibiert [Alonso and Compans, 1981; Kääriäinen et al., 1980].

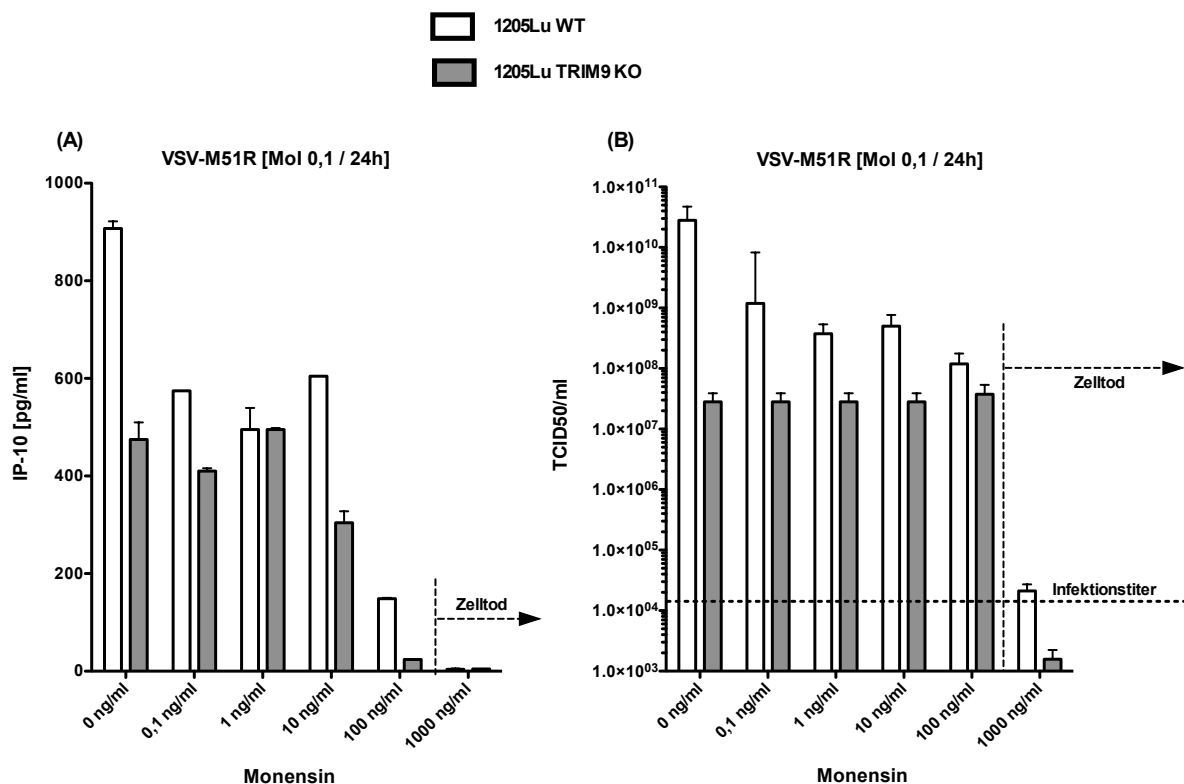


Abbildung 3.5.3: Monensin inhibiert die VSV-Replikation im Wildtyp, nicht jedoch in TRIM9-defizienten Zellen. Ein Zellgemisch bestehend aus gleichen Anteilen dreier TRIM9-defizienter 1205Lu-Klone (1205Lu-TRIM9-KO-Klone 1/3/5) sowie 1205Lu-WT-Zellen wurden mit je 100.000 Zellen pro *well* in 24-*well*-Flachbodenplatten ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Zugabe von VSV-M51R (MoI 0,1) in Kombination mit den angegebenen, aufsteigenden Mengen von Monensin zum Zellmedium. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellüberstände abgenommen und die Konzentrationen von IP-10 wurden mittels ELISA (A) gemessen. Die Virustiter in den Zellüberständen wurden mittels TCID50-*assays* gemessen (B). Mit gestrichelten Linien sind der zur Infektion verwendete Virustiter (B) und die Monensin-Konzentration, ab der lichtmikroskopisch zytopathische Effekte durch das vermehrte Absterben von Zellen zu beobachten waren, dargestellt (A/B). Die Daten sind als Mittelwerte +SEM (hier als methodischer Fehler) auf Basis des in Triplikaten durchgeführten ELISA (A) sowie der in acht Replikaten durchgeführten TCID50-*assays* (B) dargestellt. Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei $n=1$ nicht.

Die Applikation von Monensin bis zu einer Dosierung von 100 ng/ml zeigte lichtmikroskopisch bei grundsätzlich erhaltener Virusreplikation keine zytotoxischen Effekte. Bis zu einer Konzentration von 100 ng/ml wirkte sich Monensin inhibierend auf die Replikation von VSV-M51R in 1205Lu-WT-Zellen aus, während VSV-M51R in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen bis zu einer Monensin-Konzentration von 100 ng/ml unbeeinträchtigt replizierte (siehe Abb. 3.5.3, B). Die durch das Fehlen von TRIM9 vermittelte Replikationshemmung konnte damit durch die Blockade des Golgi-Apparates innerhalb dieser Monensin-Konzentration weitestgehend aufgehoben werden (siehe Abb. 3.5.3, B). Eine weitere Steigerung der Monensin-Konzentration auf 1 µg/ml bedingte hingegen zytotoxische Effekte, sodass hier die wirtsabhängige Virusreplikation und auch die Sekretion von IP-10 sowohl in TRIM9-defizienten als auch in Wildtypzellen vollständig supprimiert waren (siehe Abb. 3.5.3).

Damit ist denkbar, dass durch die TRIM9-Defizienz bereits eine Phase des viralen Replikationszyklus beeinträchtigt ist, die im Wildtyp durch eine Monensin-vermittelte Inhibition der Glykosilierung von Proteinseitenketten oder eine Inhibition des Transports viraler Proteine ebenso affiziert wird. So wäre zu erklären, dass die Applikation von Monensin in TRIM9-defizienten Zellmodellen keinen zusätzlichen Effekt hervorruft, während im Wildtyp eine Suppression der Virusreplikation zu beobachten ist.

4 Diskussion

Abschnittsüberblick	Seite
4.1 Ergebnisüberblick	103
4.2 Ergebnisdiskussion	105
4.2.1 TRIM9: Ein provirales oder antivirales Protein?	105
4.2.2 TRIM9: Immunstimulation oder Immunsuppression?	109
4.2.3 Kritische Betrachtung der Methodik	114
4.3 Ausblick	115
4.4 Relevanzbeurteilung	115

4.1 Ergebnisüberblick

Grundlage dieser Arbeit stellte ein Einzelnukleotidpolymorphismus der TRIM9-3'UTR dar, dessen Allele durch eine Kooperationsgruppe mit differentiellen Ausheilungswahrscheinlichkeiten einer Hepatitis-C-Virus-Infektion (HCV-Infektion) assoziiert werden konnten (siehe Abschnitt 1.3.1).

Darauf aufbauend konnte durch Reporter-*assays* gezeigt werden, dass dieser Einzelnukleotidpolymorphismus an Basenposition 1379 der TRIM9-3'UTR das Expressionsniveau des 5'-gelegenen Gens affektiert. Das SNP-Allel, das nach diesem Ergebnis das TRIM9-Expressionsniveau steigert, ist dabei klinisch mit einer höheren Ausheilungschance einer HCV-Infektion assoziiert (siehe Abb. 3.1.1 und Abb. 3.1.8).

Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass ebenso die Expression des endogenen TRIM9 im Rahmen einer Immunantwort reguliert wird: Nach Aktivierung von TLR3 sowie nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- β stellte sich das TRIM9-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene als supprimiert dar (siehe Abb. 3.1.4). Eine geringfügigere Suppression von TRIM9 konnte auch nach Stimulation mit rekombinanten Interferon- γ gezeigt werden (siehe Abb. 3.1.6). Im Reporter-*assay* konnte eine durch die TRIM9-3'UTR vermittelte Suppression des 5'-gelegenen Reporters nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- γ , nicht jedoch nach Stimulation mit rekombinantem Interferon- β gezeigt werden (siehe Abb. 3.1.8). Möglicherweise wird daher die TRIM9-Expression durch Interferon- β auf Transkriptionsebene reguliert, während die Regulation durch Interferon- γ auf posttranskriptioneller Ebene über die 3'UTR erfolgt.

Um den Einfluss einer stabil veränderten TRIM9-Expression auf Virusinfektionen zu untersuchen,

konnten mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung TRIM9-defiziente Zellmodelle sowie mittels retroviralen Transduktion stabil TRIM9-überexprimierende Zellmodelle etabliert werden (siehe Abschnitt 3.2).

Im Rahmen von Virusinfektionen stellte sich in der Zelllinie 1205Lu sowohl für (-)ssRNA- als auch für (+)ssRNA-Viren eine durch die TRIM9-Defizienz vermittelte, signifikante Inhibition der Virusreplikation dar (siehe Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.5, Abb. 3.3.11, Abb. 3.3.12). Dabei scheint TRIM9 während einer Infektion mit Viren (hier: VSV-p-GFP) nicht kolokalisiert vorzuliegen (siehe Abb. 3.3.10). Der in der 1205Lu-Zelllinie demonstrierte Effekt einer durch die TRIM9-Defizienz inhibierten Virusreplikation konnte in den Zelllinien A549 sowie Huh7.5 im Rahmen von Infektionen mit VSV bestätigt werden (siehe Abb. 3.3.5 und Abb. 3.3.6).

Die virusinduzierten Zytokinantworten zeigten in Abhängigkeit von der TRIM9-Expression wesentliche Unterschiede für Positiv- oder Negativ-Strang-ssRNA-Viren: So scheint die durch ssRNA-Viren negativer Polarität (VSV, SeV) induzierte Immunantwort durch die TRIM9-Defizienz signifikant vermindert zu sein und geht hier mit einer inhibierten Virusreplikation einher (siehe Abb. 3.3.2 und Abb. 3.3.3 und Abb. 3.3.4). Dies ist konsistent mit dem publizierten Effekt einer verminderten SeV-induzierten Hochregulation von Interferon- β und ISG-54 im Zuge des *knock-downs* (shRNA) von TRIM9 (siehe Abschnitt 1.2.3.2) [Versteeg et al., 2013]. Weiterhin war nach Transfektion von RNA-Extrakten VSV-infizierter Zellen, welche keine viralen Proteine enthalten und somit keine Replikation negativ polarisierter Viren ermöglichen, kein Unterschied mehr hinsichtlich der induzierten Sekretion von IP-10 in Abhängigkeit von der TRIM9-Expression zu beobachten (siehe Abb. 3.3.7). Vor diesem Hintergrund liegt die Vermutung nahe, dass im Fall von VSV primär die Replikation durch TRIM9 affektiert wird und darüber sekundär Effekte hinsichtlich der Immunantwort zu erklären sind. Im Gegensatz zu (-)ssRNA-Viren war im Rahmen von (+)ssRNA-Virus-Infektionen eine durch den Verlust von TRIM9 bedingte Steigerung der Zytokinantwort zu beobachten. Dies konnte hinsichtlich der Sekretion von IP-10 für die Viren SFV, EMCV, Mengo-Virus sowie YFV als auch im Rahmen der Transfektion von RNA-Extrakten HCV-infizierter Zellen demonstriert werden (siehe Abb. 3.3.11, Abb. 3.3.13, Abb. 3.3.12 und Abb. 3.3.14). Mit einer gesteigerten Zytokinantwort ging hierbei eine supprimierte Virusreplikation einher. Somit bleibt für (+)ssRNA-Viren die Möglichkeit einer durch den Verlust von TRIM9 primär gesteigerten Immunantwort offen, welche sekundär die Virusreplikation *in vitro* inhibiert.

Weiterhin wurde nach Einflüssen der TRIM9-Defizienz auf Signalwege von Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen antiviralen Immunabwehr gesucht. So haben Vorarbeiten der Arbeitsgruppe¹ gezeigt, dass der siRNA-vermittelte *knock-down* von TRIM9 die von RLRs und Viren induzierte Sekretion von IP-10 signifikant supprimiert. Dieser Effekt stellte sich im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich der RLR-induzierten IP-10-Sekretion als unspezifischer *Off-target*-Effekt heraus (siehe Abb. 3.4.8 und Abb. 3.4.9). Auf Basis stabil veränderter TRIM9-Expressionsniveaus konnte kein signifikanter Einfluss von TRIM9 auf die Immunantwort nach Aktivierung von RIG-I, MDA5 sowie nach Stimulation mit Interferon- β gemessen werden (siehe Abschnitt 3.4.2.1). Lediglich die Induktion von ISG-15 nach Aktivierung von RIG-I sowie MDA5 war im Rahmen der TRIM9-Defizienz

¹Die ursprünglichen Experimente im Zusammenhang des siRNA-vermittelten *knock-downs* von TRIM9 sind Teil der Promotion von Sofia Antón.

gesteigert (siehe Abb. 3.4.7). Die TLR3-induzierte Immunantwort war jedoch hinsichtlich der Induktion von ISG-15, ISG-54, Interferon- β sowie der Sekretion von IP-10 in Abwesenheit von TRIM9 gesteigert (siehe Abb. 3.4.12 und Abb. 3.4.13). Hinsichtlich der Induktion von ISG-15 waren nach Aktivierung von TLR3 dabei die deutlichsten Unterschiede zu messen (siehe Abb. 3.4.14).

Darüber hinaus wurde der kürzlich durch Shi et al. beschriebene Einfluss von TRIM9 auf die Aktivierung von NF- κ B mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Zelllinien untersucht [Shi et al., 2014]. Dabei zeigte sich in den Zelllinien HEK293, 1205Lu und A549 ein inhibitorischer Einfluss von überexprimiertem TRIM9l sowie ein fördernder Effekt der Defizienz beider Isoformen auf die Aktivierung von NF- κ B (siehe Abschnitt 3.4.1).

Um sich dem Molekularmechanismus zu nähern, über den die TRIM9-Defizienz eine inhibitorische Wirkung auf die Virusreplikation ausübt, wurde versucht, diesen Effekt durch Inhibitoren aufzuheben. So konnte die inhibierte VSV-Replikation in TRIM9-defizienten Zellen durch einen NF- κ B-Inhibitor wieder gesteigert und dem Wildtyp angenähert werden (siehe Abb. 3.5.1). Dadurch liegt nahe, dass die Phänomene einer durch die TRIM9-Defizienz gesteigerten Aktivierung von NF- κ B und einer inhibierten VSV-Replikation nicht gänzlich voneinander unabhängig sind.

Darüber hinaus bewirkte eine Blockade des Golgi-Apparates durch Monensin eine Effektschmälerung hinsichtlich der von TRIM9 betroffenen VSV-Replikation: Die Virusreplikation im Wildtyp wurde durch Zugabe von Monensin dosisabhängig inhibiert, während die TRIM9-defizienten Zellen eine von Monensin unbeeinflusste Replikationskompetenz aufwiesen (siehe Abb. 3.5.3). So ist zu diskutieren, ob durch Monensin ein bereits durch die TRIM9-Defizienz affectierter Schritt in der Virusreplikation im Wildtyp beeinflusst wird.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Inhibition endosomal lokalisierter TLRs durch Chloroquin eine supprimierende Wirkung auf die Replikation von VSV und EMCV hat, jedoch den TRIM9-vermittelten Effekt auf die Replikation nicht aufhebt (siehe Abb. 3.5.2). Es kann vor dem Hintergrund davon ausgegangen werden, dass der molekulare Wirkmechanismus von TRIM9, der die Virusreplikation affectiert, nicht durch einen Effekt auf die Signalwege der endosomalen TLRs zu erklären ist.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 TRIM9: Ein provirales oder antivirales Protein?

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Fehlen beider TRIM9-Isoformen (TRIM9l und TRIM9s) zu einer inhibierten Virusreplikation in den verwendeten Zellmodellen führt. Um die Hypothese eines ursächlichen Zusammenhanges beziehungsweise einer proviralen Funktion von TRIM9 zu erhärten, wurden transiente Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Diese stellten sich jedoch bisher als nicht zielführend heraus, da bereits die Transfektion eines Leervektors die Virusreplikation stark beeinflusste - entweder alleinig durch Zugabe lipophiler Transfektionsreagenzien oder durch präinfektiöse Einbringung von Fremd-DNA. Darüber hinaus haben Daten dieser Arbeit gezeigt, dass Effekte einer vorübergehend veränderten TRIM9-Expression (transiente Überexpres-

sion, siRNA-*knock-down*) mit denen eines stabil affizierten Expressionsniveaus (*knock-out*, Überexpression durch retrovirale Transduktion) nur in Teilen übereinstimmen (siehe z.B. Abb. 3.3.8 und Abb. 3.3.5). Eine stabile Rekonstitution von TRIM9 in TRIM9-defizienten Zelllinien mittels retroviraler Transduktion steht daher noch aus, um den ursächlichen Zusammenhang zwischen dem stabilen Verlust von TRIM9 und einer dadurch inhibierten Replikationskompetenz *in vitro* zu demonstrieren. Bis dahin steht die Hypothese einer proviralen Funktion von TRIM9 zur Diskussion.

Einerseits kann die Virusreplikation intrazellulär direkt durch Restriktionsfaktoren oder gegensätzlich durch fördernd in den Replikationszyklus eingreifende Proteine beeinflusst werden. Die Rolle einiger TRIM-Proteine als virale Restriktionsfaktoren wurde in Abschnitt 1.2.2 erläutert. Auf der anderen Seite ist eine affizierte Virusreplikation ebenso als Sekundäreffekt einer veränderten Immunantwort, eines beeinflussten Zellzyklus beziehungsweise Stoffwechsels des Wirts oder veränderter Membraneigenschaften denkbar, welche beispielsweise die endozytotische Aufnahme oder das *budding* der Virionen beeinflussen [Gonzalez Plaza et al., 2016; Wesolowski and Paumet, 2010]. Hinsichtlich TRIM9 sind diesbezüglich neben direkten Proteinfunktionen vor dem Hintergrund einer E3-Ubiquitinligase-Aktivität ebenso indirekte Wirkungen zu diskutieren, die möglicherweise über eine TRIM9-vermittelte Ubiquitinierung und Degradation anderer Proteine zustande kommen.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich für positiv- wie auch negativ-polarisierte ssRNA-Viren eine mit der stabilen TRIM9-Defizienz assoziierte Inhibition der Virusreplikation. Mit einer inhibierten Virusreplikation ging dabei insbesondere im Rahmen von Infektionen mit VSV eine supprimierte Produktion von Zytokinen einher (siehe Abb. 3.3.1, Abb. 3.3.2, Abb. 3.3.4), welche induziert durch isolierte VSV-RNA jedoch nicht mehr in Abhängigkeit von der TRIM9-Expression variierte (siehe Abb. 3.3.7). Die Transfektion negativ-polarisierter viraler RNA ermöglicht dabei in Ermangelung viraler Proteine keine Virusreplikation. So liegt es im Rahmen einer stabilen TRIM9-Defizienz nahe, dass eine verminderte Immunantwort nach Infektion mit VSV sekundär auf ein vermindertes Aktivitätsniveau wirtseigener PRRs zurückzuführen ist, welche durch eine primär inhibierte Virusreplikation einer zeitlich kumulativ reduzierten PAMP-Konzentration ausgesetzt sind. Auf Basis der Experimente mit VSV scheint die durch die TRIM9-Defizienz inhibierte Virusreplikation keine Folge einer gesteigerten antiviralen Immunantwort zu sein.

Damit rückt ein möglicherweise von TRIM9 beeinflusster Metabolismus oder Zellzyklus des Wirts als Ursache einer durch die TRIM9-Defizienz verminderten Virusreplikation in den Fokus. Lichtmikroskopisch wie auch durchflusszytometrisch haben sich hinsichtlich des Wachstumsverhaltens sowie der Zellmorphologie (Granularität und Zellgröße) keine eindeutigen Unterschiede zwischen TRIM9-defizienten Zellen und deren Wildtypen gezeigt. Etwaige Einflüsse auf den Zellzyklus wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht im Detail untersucht. Vor dem Hintergrund aktueller Publikationen ist darüber hinaus insbesondere die Rolle eines durch den Verlust von TRIM9 gesteigerten Aktivitätsniveaus von NF- κ B (siehe Abschnitt 1.2.3.2 und [Shi et al., 2014]) als auch der Einfluss einer durch TRIM9 affizierten SNARE-Komplex-abhängigen Exozytose (siehe Abschnitt 1.2.3.1 und [Winkle et al., 2014]) zu diskutieren.

Transkriptionelle Regulatoren aus der NF- κ B-Familie induzieren eine Vielzahl unterschiedlicher Gene, darunter diverse Proteine im Kontext einer Immunantwort wie Chemokine, Zytokine oder

Immunrezeptoren [Ghosh et al., 1998]. Neben der zentralen Stellung als Immunregulator induziert NF- κ B weiterhin anti-apoptotische sowie proliferative Gene [Karin et al., 2002]. Die virusinduzierte Aktivierung von NF- κ B hat damit einen ambivalenten Charakter: Einerseits trägt die virusinduzierte Aktivierung von NF- κ B zu einer antiviralen Immunantwort bei. Dem stehen andererseits proliferative sowie anti-apoptotische Wirkungen gegenüber, welche die parasitäre Ausnutzung des Wirtszellmetabolismus durch Viren im Sinne ihrer eigenen Replikation fördern [Hiscott et al., 2001]. Weiterhin trägt eine Inhibition der virusinduzierten Apoptose zwar direkt zur Virusreplikation bei, reduziert jedoch ebenso die durch Apoptose bedingte Freisetzung von Viren und damit deren Ausbreitung [Hiscott et al., 2001]. Ob sich die Aktivierung von NF- κ B *in vitro* fördernd oder inhibierend auf die Virusreplikation auswirkt, ist damit nicht eindeutig vorherzusagen. Die TRIM9-defizienten Zellmodelle, in denen diese Arbeit eine reduzierte Replikationskompetenz verschiedener Viren zeigt, weisen konsistent mit Shi et al. sowohl eine erhöhte Basalaktivität von NF- κ B als auch eine gesteigerte Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit TNF- α oder PMA auf (siehe Abb. 3.4.2 und 3.3.1 und [Shi et al., 2014]). Auf Basis einer mutmaßlich primär verminderten Virusreplikation lässt die reduzierte VSV-induzierte Immunantwort TRIM9-defizienter Zellen jedoch eine verminderte Aktivierung von NF- κ B vermuten. Dies ist konsistent mit der demonstrierten verminderten Induktion (siehe Abb. 3.3.4) von folgenden Genen, welche gemäß der aufgeführten Publikationen NF- κ B abhängig induziert werden: TNF- α [Shakhov et al., 1990], IL-1 β [Hiscott et al., 1993], IL-8 [Kunsch and Rosen, 1993], IFN- β [Hiscott et al., 1989; Lenardo et al., 1989] sowie IP-10 [Ohmori and Hamilton, 1993]. Jedoch bleibt die Möglichkeit offen, dass eine präinfektiös durch die TRIM9-Defizienz gesteigerte Basalaktivität von NF- κ B die Virusreplikation innerhalb eines 24-stündigen Infektions-*assays* beeinflusst. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der TRIM9-abhängigen NF- κ B-Aktivität und der Virusreplikation gibt die Tatsache, dass die Zugabe des NF- κ B-Inhibitors ACHP während der VSV-Infektion die Replikationskompetenz von VSV in TRIM9-defizienten Zellen jener im korrespondierenden Wildtyp dosisabhängig wieder annähert (siehe Abb. 3.5.1). Ein verantwortlicher Molekularmechanismus konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht näher spezifiziert werden.

Weiterhin ist denkbar, dass eine von TRIM9 beeinflusste Virusreplikation als Sekundäreffekt von durch TRIM9 affektierten, endozytotischen oder exozytotischen Prozessen zustande kommt (siehe Abschnitt 1.2.3.1 und [Winkle et al., 2014]). Unter Applikation von Monensin, welches durch Blockade des Golgi-Apparates unter anderem den intrazellulären Transport des VSV-Glykoproteins zur Wirtszellmembran inhibiert, zeigte sich dosisabhängig eine Inhibition der Replikationskompetenz im Wildtyp, während jene in TRIM9-defizienten Zellen von Monensin unbeeinflusst blieb (siehe Abschnitt 3.5.3 und Abb. 3.5.3) [Alonso and Compans, 1981; Kääriäinen et al., 1980]. Eine Monensin-vermittelte Replikationsinhibition ist erwartungsgemäß, da die Freisetzung neuer Viren unter Mitnahme von G-Protein-enthaltender Wirtszellmembran gestört ist. VSV-G-Protein-enthaltende Lipid-Doppelschicht-Membran als Virushülle ist jedoch zur Infektion neuer Zellen nötig, welche auf Basis der Interaktion des viralen G-Proteins mit Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen abläuft. Dass TRIM9-defiziente Zellen gegensätzlich zum Wildtyp jedoch eine von Monensin unbeeinflusste Replikationskompetenz aufweisen, deutet möglicherweise darauf hin, dass die TRIM9-Defizienz bereits Abschnitte des viralen Replikationszyklus inhibiert, welche im Wildtyp durch Monensin beeinflusst werden. Ist durch die TRIM9-Defizienz daher der Transport viraler

Proteine zur Wirtszellmembran gestört? Um dieser Hypothese weiter nachzugehen, wäre es unter anderem interessant zu prüfen, ob in TRIM9-defizienten Zellen ebenso die Replikationskompetenz unbehüllter Viren eingeschränkt ist, deren Freisetzung und Infektiosität von Interaktionen mit der Wirtszellmembran unabhängiger ist. Experimente dieser Art wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht durchgeführt.

Gegensätzlich zu Ergebnissen dieser Arbeit wurde kürzlich durch Qin et al. die kurze Isoform von TRIM9 (TRIM9s) als antivirales Protein beschrieben, während eine vergleichbar ausgeprägte antivirale Funktion der langen Isoform (TRIM9l) verneint wurde [Qin et al., 2016]. Dabei basieren die durch Qin et al. demonstrierten Effekte überwiegend auf der transienten Überexpression von TRIM9s/TRIM9l sowie gegensätzlich auf *Loss-of-function*-Experimenten mittels isoformspezifischen siRNAs [Qin et al., 2016]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde in der Zelllinie A549 die Replikation von VSV einerseits in Abhängigkeit von transient überexprimiertem TRIM9l (siehe Abb. 3.3.8) sowie andererseits als Funktion stabil veränderter TRIM9-Expressionsniveaus quantifiziert (siehe Abb. 3.3.5). Hinsichtlich der verwendeten Zelllinie sowie des Virusstammes sind die Ergebnisse dieser Arbeit so mit jenen nach Qin et al. vergleichbar, zeigen jedoch teils gegensätzliche Effekte [Qin et al., 2016]: Einerseits konnte im Rahmen dieser Arbeit eine antivirale Wirkung auch für die transient überexprimierte, lange Isoform von TRIM9 demonstriert werden (siehe Abb. 3.3.8). Andererseits konnte umfassend demonstriert werden, dass ebenso der gemeinsame Verlust beider TRIM9-Isoformen im Rahmen eines stabilen *knock-outs* replikationsinhibierende Effekte hat. Ist dies ein Widerspruch? Aus methodischer Sicht basiert der überwiegende Anteil der von Qin et al. präsentierten Ergebnisse auf der präinfektiösen Einbringung fremder Nukleinsäuren (im Rahmen der Transfektion von siRNA oder Expressionsplasmiden) [Qin et al., 2016]. Einerseits wirft dieses die Frage auf, inwieweit Transfektionsreagenzien Membraneigenschaften der Wirtszellen präinfektiös beeinflussen beziehungsweise ob die Einbringung fremder Nukleinsäuren bereits präinfektiös eine immunogene Wirkung hat. Andererseits ist anzuzweifeln, ob Experimente auf Basis einer transienten Überexpression denn überhaupt physiologische Effekte vor dem Hintergrund kurzzeitig unphysiologisch erhöhter Proteinkonzentrationen demonstrieren. Gegensätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit Effekte stabil veränderter TRIM9-Expressionsniveaus charakterisiert: Mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung beziehungsweise retroviraler Transduktion wurden TRIM9-defiziente sowie stabil TRIM9-überexprimierende Zellmodelle etabliert, in denen die Replikationskompetenz von Viren ohne die Notwendigkeit einer präinfektiösen und damit potentiell artifiziellen Vorbehandlung in Abhängigkeit von der TRIM9-Expression quantifiziert werden konnte. Darüber hinaus wird damit indirekt sichergestellt, dass alle verwendeten Zellmodelle sich an ein verändertes TRIM9-Expressionsniveau im Rahmen ihres eigenen Überlebens adaptieren konnten und damit nicht unphysiologisch veränderte Proteinkonzentrationen herbeigeführt wurden. In dieser Hinsicht ist die methodische Herangehensweise dieser Arbeit zur Quantifizierung einer TRIM9-abhängigen Virusreplikation jener nach Qin et al. überlegen [Qin et al., 2016]. Letztlich bringt die Zusammenführung der Ergebnisse jedoch die Erkenntnis, dass Effekte kurzfristig veränderter TRIM9-Expressionsniveaus (fokussierend auf transiente Überexpression) mit denen einer stabilen TRIM9-Defizienz nicht konsistent sind. Dies kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass unphysiologisch erhöhte TRIM9-Expressionsniveaus zytotoxische oder zytostatische Effekte haben, welche sich folgend inhibierend auf die Virusreplikation auswirken könnten. Dafür spricht, dass im

Rahmen dieser Arbeit mittels retroviraler Transduktion maximal eine zweieinhalbfache Steigerung der TRIM9-Expression erreicht werden konnte, während der Großteil transduzierter Zellen verstarb (siehe Abb. 3.2.10).

Zusammenfassend demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund aktueller Literatur gegensätzliche Effekte auf die Virusreplikation in Abhängigkeit davon, ob das Expressionsniveau von TRIM9 nur vorübergehend oder stabil beeinflusst wird. Aufbauend auf publizierter Literatur konnte mit dieser Arbeit erstmals demonstriert werden, dass der stabile, gemeinsame Verlust beider Isoformen von TRIM9 (*knock-out*) einen inhibitorischen Einfluss auf die *In-vitro*-Replikation behüllter ssRNA-Viren positiver wie negativer Polarität hat. Ergebnisse im Rahmen von Infektionsexperimenten mit VSV deuten an, dass die Virusreplikation dabei nicht durch eine primär gesteigerte, antivirale Immunantwort inhibiert wird. Die ursächlichen Molekularmechanismen bleiben ungeklärt, sind jedoch möglicherweise im Zusammenhang eines von TRIM9 direkt oder indirekt betroffenen Zellzyklus oder Stoffwechsels der Wirtszellen zu vermuten. Dabei erscheint bezüglich des Wirtszellmetabolismus vor dem Hintergrund durch Winkle et al. publizierter Effekte von TRIM9 auf die Endo- und Exozytose insbesondere der von TRIM9 potentiell betroffene Membranstoffwechsel interessant, welcher möglicherweise Einfluss auf das *budding* oder auf die endozytotische Aufnahme von Viren nimmt [Winkle et al., 2014].

4.2.2 TRIM9: Immunstimulation oder Immunsuppression?

Viele TRIM-Proteine haben sich in den letzten Jahren als Regulatoren der angeborenen antiviralen Immunität herausgestellt (siehe Abschnitt 1.2.2). Auch für TRIM9 ließen die zu Beginn der Datenerhebung dieser Arbeit verfügbaren Vorarbeiten und Publikationen eine immunstimulatorische Rolle von TRIM9 innerhalb des Signalweges RIG-I ähnlicher Rezeptoren vermuten (siehe Abschnitte 1.2.3.2 und 1.3.2). Im Nachhinein erschienene Publikationen¹ legen inzwischen eine ausbalancierende Rolle von TRIM9 zwischen der Aktivierung von NF- κ B und der Phosphorylierung von IRF3 nahe: Während TRIM9 im Rahmen einer antiviralen Immunantwort die Phosphorylierung von IRF3 fördert, wird durch TRIM9 die Aktivierung von NF- κ B inhibiert (siehe Abschnitt 1.2.3.2 und Abb. 1.2.3) [Qin et al., 2016; Shi et al., 2014]. Da diverse Zytokine in Abhängigkeit von diesen Transkriptionsfaktoren induziert werden - insbesondere die Promotorregion von Interferon- β enthält Bindungsstellen für NF- κ B als auch für IRF3 - wären entsprechend dieser Publikationen Einflüsse der TRIM9-Expression auf die durch antivirale Mustererkennungsrezeptoren induzierten Immunantworten zu erwarten.

Konsistent mit Shi et al. konnte im Rahmen dieser Arbeit eine inhibitorische Wirkung von TRIM9 auf die PMA- sowie TNF- α -induzierte Aktivierung von NF- κ B demonstriert werden [Shi et al., 2014]. Alle etablierten TRIM9-defizienten Zellmodelle wiesen entsprechend in Reporter-*assays* eine im Wildtypvergleich gesteigerte Aktivität von NF- κ B auf (siehe Abschnitt 3.4.1). Durch Charak-

¹Die experimentellen Daten dieser Arbeit wurden im Zeitraum von März 2014 bis Mai 2015 erhoben. Die Publikationen [Shi et al., 2014] sowie [Qin et al., 2016] sind während beziehungsweise nach dieser Zeit veröffentlicht worden und beschreiben erstmals auf molekularer Ebene die Rolle von TRIM9 während Virusinfektionen. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Fragestellung ist daher ebenso wie die experimentelle Herangehensweise von diesen Publikationen unberührt. Nichtsdestotrotz werden die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse im Kontext der später erschienenen Publikationen diskutiert.

terisierung der Immunantwort TRIM9-defizienter Zellen mittels ELISA beziehungsweise qRT-PCR konnte im Wildtypvergleich jedoch kein signifikanter Einfluss der TRIM9-Expression auf die RLR-induzierte Immunantwort gemessen werden. Lediglich die Induktion von ISG-15 stellte sich im Rahmen der TRIM9-Defizienz als geringfügig gesteigert dar (siehe Abschnitt 3.4.2.1, Abb. 3.4.4, Abb. 3.4.5 und Abb. 3.4.7). Auch auf die RLR-induzierte Aktivität des Interferon- β -Promotors konnte mittels Reporter-*assays* kein Einfluss der TRIM9-Defizienz gemessen werden (siehe Abb. 3.4.6). Während der stabile *knock-out* von TRIM9 keine Einflüsse auf die RLR-induzierte Sekretion von IP-10 zeigte, war konsistent mit Vorarbeiten der Arbeitsgruppe¹ eine Inhibition der Sekretion von IP-10 im Rahmen des siRNA-vermittelten *knock-downs* von TRIM9 reproduzierbar (siehe Abb. 3.4.8). Da jedoch die Applikation derselben siRNAs auch in TRIM9-defizienten Zellen die RLR-induzierte Immunantwort supprimierte (siehe Abb. 3.4.9), ist der kausale Zusammenhang zwischen dem demonstrierten, immunsuppressiven Effekt und dem *knock-down* von TRIM9 kritisch sowie vor dem Hintergrund möglicher *off-targets* der siRNAs zu betrachten (siehe Abschnitt 3.4.2.2). Ein gemeinsames *off-target* beider verwendeten siRNAs ist das Protein „Ninein“. Ob ein möglicher *knock-down* von Ninein für die Reduktion der IP-10 Sekretion in den dargestellten Experimenten verantwortlich gewesen ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. Letztlich konnte kein eindeutiger Effekt des *knock-outs* von TRIM9 auf die RLR-induzierte Immunantwort demonstriert werden. Aktuelle Literatur berücksichtigend ist dabei im Zusammenhang mit TRIM9-defizienten Zellen denkbar, dass die gesteigerte Aktivierung von NF- κ B von einer verminderten Phosphorylierung von IRF3 kompensiert wird und damit keine Effekte hinsichtlich der Induktion von beiden Transkriptionsfaktoren beeinflusster Gene zu messen sind. Diesbezüglich ist ebenso zu diskutieren, ob messbare Effekte zelllinienspezifisch sowie in starker Abhängigkeit von dem gewählten *read-out* auftreten: Einerseits ist zu berücksichtigen, dass zelllinienspezifisch IRF3 oder NF- κ B gegebenenfalls eine gegenüber dem jeweils anderen Transkriptionsfaktor dominantere Rolle einnimmt. Andererseits dürfte sich die Expression der als *read-out* gewählten Gene hinsichtlich ihrer Abhängigkeit von NF- κ B beziehungsweise IRF3 unterscheiden.

Im Gegensatz zu den RLRs führte die Aktivierung von TLR3 im Rahmen dieser Arbeit zu einer vom Wildtyp abweichenden Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen: TRIM9-defiziente Zellen wiesen im Wildtypvergleich eine gesteigerte TLR3-induzierte Sekretion von IP-10 (siehe Abb. 3.4.12) sowie eine erhöhte TLR3-vermittelte Induktion von IFN- β , ISG-15 und ISG-54 auf (siehe Abb. 3.4.13 und Abb. 3.4.14). Ob sich dieser Phänotyp als stabil erweist oder artifiziell durch Nebeneffekte der Einzelzellklonierung begünstigt wird, muss vor dem Hintergrund beträchtlicher Unterschiede zwischen den hier verwendeten Einzelzellklonen hinsichtlich ihrer Sekretion von IP-10 weiter validiert werden (siehe Abb. 3.4.12). Zwar führt die Aktivierung von TLR3 wie auch von RLRs sowohl zur Phosphorylierung von IRF3 als auch zur Kerntranslokation von NF- κ B [Akira et al., 2006]. Die im Rahmen der TRIM9-Defizienz gesteigerte Immunantwort lässt jedoch vermuten, dass der Effekt einer gesteigerten Aktivierung von NF- κ B den nach Qin et al. beschriebenen Effekt einer durch die TRIM9-Defizienz verminderten Phosphorylierung von IRF3 überwiegt [Qin et al., 2016].

¹Die erwähnten Vorarbeiten sind Teil der Promotion von Sofia Antón

Vor dem Hintergrund, dass in den verwendeten Zellmodellen die RLR-induzierte Immunantwort von der TRIM9-Defizienz weitestgehend unbeeinflusst blieb, während die TLR3-induzierte Immunreaktion sich durch den Verlust von TRIM9 als gesteigert herausstellte, lassen sich unterschiedliche Effekte der TRIM9-Expression auf die durch Viren induzierten Immunantworten einordnen. Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 erläutert, ist die verminderte VSV-induzierte Immunantwort TRIM9-defizienter Zellen mutmaßlich auf eine primär inhibierte Virusreplikation zurückzuführen. Entsprechend blieb die durch die Transfektion viraler VSV-RNA induzierte Immunantwort, welche von einer aktiven Virusreplikation so unbeeinflusst bleibt, von der TRIM9-Expression unberührt (siehe Abb. 3.3.7). Dies ist konsistent mit der demonstrierten, von TRIM9 unbeeinflussten 3pRNA-induzierten Immunantwort sowie mit Publikationen, nach denen VSV maßgeblich durch RIG-I erkannt wird [Furr et al., 2010; Huesser et al., 2011].

Gegensätzlich zur verminderten Immunantwort nach Infektionen mit (-)ssRNA-Viren wie VSV oder SeV zeigten TRIM9-defiziente Zellen im Rahmen von Infektionen mit (+)ssRNA-Viren eine im Wildtypvergleich gesteigerte Sekretion von IP-10. Dies konnte für Infektionen mit den Viren SFV (Alphavirus, siehe Abb. 3.3.11), YFV (Flavivirus, siehe Abb. 3.3.12), EMCV (Picornavirus, siehe Abb. 3.3.11) und Mengo-Virus (Picornavirus, siehe Abb. 3.3.13) wie auch für die Transfektion von RNA-Isolaten HCV-infizierter Zellen (Vgl. Abb. 3.3.14) demonstriert werden (siehe Abschnitt 3.3.2). Für den (-)ssRNA-Virus VSV konnte gezeigt werden, dass der Effekt einer verminderten VSV-induzierten Zytokinantwort in Abwesenheit von TRIM9 nur bei stattfindender Virusreplikation vorliegt. Ob der TRIM9-abhängige Effekt auf die virusinduzierte Immunantwort auch bei (+)ssRNA-Viren auf eine vollständig stattfindende Replikation angewiesen ist, konnte jedoch nicht sicher geklärt werden. Zwar wird sowohl durch eine Infektion mit den sich in 1205Lu-Zellen vollständig replizierenden (+)ssRNA-Viren SFV, YFV und EMCV als auch durch eine Infektionen mit dem in 1205Lu-Zellen nicht vollständig replikationskompetenten Mengo-Virus als auch durch die Transfektion von RNA-Isolaten HCV-infizierter Zellen eine von dem TRIM9-Expressionsniveau beeinflusste Zytokinantwort induziert. Jedoch kann trotzdem nicht eindeutig belegt werden, dass eine gesteigerte Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen nach einer Infektion mit (+)ssRNA-Viren unabhängig von deren Virusreplikation zustande kommt: Einerseits ist trotz nicht ansteigender Virustiter im Zellüberstand nach Infektion mit Mengo-Virus denkbar, dass intrazellulär eine Virusreplikation stattgefunden hat und nur die Freisetzung neuer Viren in den Extrazellulärraum gestört ist. Andererseits ermöglicht auch die Transfektion von genomischer HCV-RNA aufgrund ihrer positiven Polarität eine Virusreplikation, auch wenn der Hepatotropismus des Virus eine Neuinfektion von 1205Lu-Zellen vermutlich verhindert. In beiden Fällen kann also eine zumindest in Teilen funktionale, intrazelluläre Virusreplikation als Grundlage des Effektes einer von TRIM9 beeinflussten Immunantwort nicht sicher ausgeschlossen werden.

Damit gibt es in Zusammenschau mit den Effekten im Rahmen von VSV-Infektionen zwei mögliche Erklärungsansätze für unterschiedliche Effekte in Abhängigkeit von der Viruspolarität: Zum einen könnte gegensätzlich zu Infektionen mit (-)ssRNA-Viren die TRIM9-Defizienz die von (+)ssRNA-Viren induzierte Immunantwort primär steigern, welche sich dann sekundär inhibierend auf die Virusreplikation auswirken würde. Andererseits ist denkbar, dass die eingeschränkte Replikation von ssRNA-Viren positiver als auch negativer Polarität in TRIM9-defizienten Zellen auf dieselbe

Weise zustande kommt und zusätzlich durch die TRIM9-Defizienz das immunstimulatorische Potenzial von (+)ssRNA-Viren als unabhängiger Effekt gesteigert wird. In diesem Fall würde es trotz einer im Rahmen der supprimierten Virusreplikation von (+)ssRNA-Viren reduzierten PAMP-Konzentration zu einer gesteigerten Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen kommen, was für eine erhebliche Immunogenitätssteigerung durch den Verlust von TRIM9 spräche. Dies wird weiterhin dadurch gestützt, dass die Transfektion von RNA-Isolaten HCV infizierter Zellen zu einer durch die TRIM9-Defizienz signifikant gesteigerten Sekretion von IP-10 führte (siehe Abb. 3.3.14). Letztlich führen beide Erklärungsansätze jedoch zu der Annahme, dass es durch die TRIM9-Defizienz zu einer gesteigerten Zytokinantwort (hier: Sekretion von IP-10) im Rahmen der Infektion mit (+)ssRNA-Viren kommt.

In Zusammenschau der Ergebnisse werfen Unterschiede hinsichtlich der Viruspolarität die Frage nach möglicherweise von TRIM9 betroffenen Mechanismen auf, welche eine gesteigerte Immunantwort im Rahmen der Infektion mit (+)ssRNA-Viren erklären, jedoch keinen Einfluss auf die RLR-induzierte Immunantwort und keinen vergleichbaren Effekt auf die (-)ssRNA-Virus-induzierte Immunantwort haben. Während RIG-I kurze doppelsträngige RNA sowie zugängliche 3pRNA-Modifikationen zytoplasmischer RNA als PAMP erkennt, werden sowohl MDA5 (zytoplasmisch) als auch TLR3 (endosomal) durch längere Abschnitte doppelsträngiger RNA aktiviert [Akira et al., 2006]. Aktuelle Literatur legt nahe, dass (-)ssRNA-Viren wie Paramyxoviridae (zugehörig: SeV) oder VSV maßgeblich über RIG-I erkannt werden [Furr et al., 2010; Huesser et al., 2011; Kato et al., 2006]. Doppelsträngige RNA-Fragmente entstehen dagegen vorrangig im Rahmen der Replikation von (+)ssRNA-Viren, weniger durch die Replikation von ssRNA-Viren negativer Polarität [Weber et al., 2006]. Demzufolge ist naheliegend, dass dsRNA-erkennende PRRs wie MDA5 oder TLR3 für die Detektion von (+)ssRNA-Viren eine dominantere Rolle einnehmen. Entsprechend werden die positiv polarisierten Picornaviridae (Mengo-Virus, EMCV) maßgeblich durch MDA5 und weniger durch RIG-I erkannt [Kato et al., 2006]. Hinsichtlich des (+)ssRNA-Virus SFV wurde beschrieben, dass die dsRNA-bindende Proteinkinase (PKR) die Interferoninduktion während Infektionen mit SFV, nicht jedoch im Rahmen von Infektionen mit SeV beeinflusst [Schulz et al., 2010]. Das (+)ssRNA-Virus YFV (Flavivirus) betrachtend sind zwar die Funktionen von RLRs wenig untersucht, jedoch konnte nach Querec et al. eine Hochregulation sowohl von RIG-I als auch von MDA5 im Rahmen der YFV-Infektion peripherer monozytärer Blutzellen (PBMCs) demonstriert werden [Querec et al., 2009]. Auch die Beteiligung verschiedener TLRs konnte im Rahmen der Detektion von Flaviviridae demonstriert werden [Nazmi et al., 2014]. Hinsichtlich Hepatitis-C konnte die Wahrscheinlichkeit einer Spontanausheilung sowohl mit genetischen Polymorphismen von MDA5 als auch von TLR3 assoziiert werden [Geng et al., 2016; Hoffmann et al., 2015].

Letztlich kann auf Basis dieser Literatur davon ausgegangen werden, dass dsRNA-erkennenden PRRs insbesondere im Rahmen von Infektionen mit ssRNA-Viren positiver Polarität eine wichtige Rolle zukommt. Während in den hier verwendeten Zellmodellen die Aktivierung von MDA5 durch synthetische Liganden nicht zu einer von der TRIM9-Expression beeinflussten Immunantwort führte, war eine mit der TRIM9-Defizienz vergesellschaftete Steigerung der TLR3-induzierten Immunantwort zu messen. Dies ist konsistent mit einer gesteigerten (+)ssRNA-Virus-induzierten Sekretion von IP-10, da als Replikationsintermediate dieser Viren doppelsträngige RNA-Fragmente auftre-

ten. Diese mutmaßlich TLR3-aktivierenden Replikationsintermediate sind dabei jedoch vorrangig zytoplasmatisch zu erwarten, während die PAMP-bindende TLR3-Domäne im Rahmen einer transmembranären Lokalisation von TLR3 extrazellulär oder im Lumen von Endosomen beziehungsweise Lysosomen zu erwarten ist. Wie kommt es dabei zur Interaktion von intrazellulären dsRNA-Replikationsintermediaten und extrazellulären PAMP-bindenden TLR3-Domänen? Hinsichtlich der lipophilen Transfektion von RNA-Isolaten virusinfizierter Zellen, welche mutmaßlich ebenso virale Replikationsintermediate enthalten, ist ein direkter Kontakt mit endosomalen TLRs zu erwarten. Konsistent mit der Hypothese eines Auftretens TLR3-aktivierender PAMPs in Abhängigkeit von der Viruspolarität war die Immunantwort durch Transfektion von RNA-Isolaten VSV-infizierter Zellen von der TRIM9-Defizienz unbeeinflusst (siehe Abb. 3.3.7), während die Transfektion von RNA-Isolaten HCV-infizierter Zellen eine deutlich gesteigerte Immunantwort in TRIM9-defizienten Zellen bedingte (siehe Abb. 3.3.14). Im Rahmen der Infektion mit funktionsfähigen Virionen ergeben sich verschiedene Mechanismen, die eine Interaktion zwischen zytoplasmatischen Replikationsintermediaten und endosomalen TLR3-Domänen begünstigen: Einerseits erfolgt das exozytoseähnliche *budding* umhüllter Viren mutmaßlich unter Mitnahme minimaler Anteile des Wirtszytoplasmas, sodass dieses bei endozytotischer Wiederaufnahme sezernierter Virionen in Kontakt mit Endo- sowie Lysosomen kommt. Andererseits können ebenso zytopathische Effekte begünstigend wirken: Im Rahmen (virusinduzierter) apoptotischer Prozesse entstehen zytoplasmahaltige Apoptosevesikel, welche potenziell von umliegenden Zellen endozytotisch aufgenommen und so zur Aktivierung des endosomalen TLR3 führen können [Kariko et al., 2004; Vercammen et al., 2008]. Auch unabhängig davon ist eine Aufhebung intrazellulär-räumlicher Barrieren im Rahmen von virussinduzierten zytopathischen Effekten vorstellbar.

Zusammenfassend war im Rahmen dieser Arbeit kein signifikanter Einfluss des stabilen Verlustes von TRIM9 auf die RLR-induzierte Immunantwort zu messen. Vor dem Hintergrund später erschienener Literatur ist nach Shi et al. sowie Qin et al. denkbar, dass sich in den hier verwendeten Zellmodellen von TRIM9 vermittelte, fördernde Effekte auf die Phosphorylierung von IRF3 sowie inhibierende Effekte auf die Aktivierung von NF- κ B aufwiegen, sodass kein Einfluss auf die von beiden Transkriptionsfaktoren gesteuerte Typ-I IFN-basierte Immunantwort zu messen ist [Qin et al., 2016; Shi et al., 2014]. Gegensätzlich wiesen TRIM9-defiziente Zellen im Wildtypvergleich eine gesteigerte TLR3-vermittelte sowie von (+)ssRNA-Viren induzierte Immunantwort auf. Dabei wäre auf Basis der Datenlage dieser Arbeit die weiterführende Hypothese denkbar, dass im Rahmen der Replikation von (+)ssRNA-Viren vermehrt auftretende dsRNA-Replikationsintermediate über eine Aktivierung von TLR3 zu einer gesteigerten Zytokinantwort in TRIM9-defizienten Zellen führen. Jedoch ist hier kritisch anzumerken, dass weiterführende Daten der Arbeitsgruppe auf eine in MAVS-defizienten Zellen ausbleibende Induktion von IP-10 und Interferon- β nach YFV-Infektion hindeuten (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Eine relevante Beteiligung von TLR3 an der YFV-induzierten Immunantwort erscheint vor diesem Hintergrund unwahrscheinlich. Weitere Studien sind daher notwendig, um den differentiellen Einfluss der TRIM9-Expression auf die durch ssRNA-Viren positiver oder negativer Polarität induzierte Zytokinantwort auch unabhängig von einer TLR3-Beteiligung zu erklären.

4.2.3 Kritische Betrachtung der Methodik

Die Arbeitshypothese dieser Arbeit geht auf einen genetischen Einzelnukleotidpolymorphismus der TRIM9-3'UTR zurück, dessen Allele durch eine Kooperationsgruppe klinisch mit einer differentiellen Spontanausheilungswahrscheinlichkeit einer HCV-Infektion korreliert werden konnten. Dabei legten Reporter-*assays* dieser Arbeit nahe, dass das Expressionsniveau von TRIM9 durch jenes Polymorphismus-Allel gesteigert wird, welches zugleich das HCV-Chronifizierungsrisiko senkt. Entsprechend wäre eine protektive Funktion von TRIM9 anzunehmen. *In vitro* stellte sich im Rahmen dieser Arbeit durch *Loss-of-function*-Experimente jedoch eine in TRIM9-defizienten Zellen inhibierte Virusreplikation dar, was eine provirale Funktion von TRIM9 vermuten ließe. Ist dies ein Widerspruch?

Während durch den genetischen Polymorphismus die TRIM9-Expression mutmaßlich regulativ beeinflusst wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit vorrangig Effekte des vollständigen Verlustes von TRIM9 charakterisiert. Dabei ist grundsätzlich nicht auszuschließen, dass der vollständige Verlust eines Proteins gegensätzlich zu einer nur begrenzten Expressionsregulation weitergehende Auswirkungen oder zusätzliche Effekte auf Zellmodelle hat. Wenn die Replikation verschiedener Viren in Abhängigkeit von der TRIM9-Expression der Wirtszellen als *read-out* von Experimenten gewählt wurde, ist dabei immer die Abhängigkeit der Virusreplikation von Zellzyklus und Metabolismus der Wirtszellen zu bedenken. Möglicherweise wirkt sich der vollständige Verlust von TRIM9 auf grundlegende Wirtszellfunktionen und damit sekundär auf die Virusreplikation aus, sodass gegenläufige Effekte eines nur in Grenzen verminderten TRIM9-Expressionsniveaus verdeckt werden. Dieser Gedanke liegt insbesondere nahe, da Ergebnisse dieser Arbeit teils nicht mit in der Literatur nach Qin et al. demonstrierten Effekten eines *knock-downs* von TRIM9 konsistent sind [Qin et al., 2016]. Vor dem Hintergrund verschiedener zugleich exprimierter Isoformen von TRIM9 ist weiterhin zu berücksichtigen, dass im Rahmen dieser Arbeit weitestgehend Effekte von deren gemeinsamem Verlust charakterisiert wurden, ohne dabei auf möglicherweise unterschiedliche Funktionen der Isoformen einzugehen.

TRIM9-defiziente sowie stabil TRIM9-überexprimierende Zellmodelle wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung sowie retroviraler Transduktion etabliert und entstanden aus einer im Rahmen dieser Methodik angewandten Einzelzellklonierung. Auf diese Weise konnten Effekte einer stabil veränderten TRIM9-Expression untersucht werden, während in bisheriger Literatur i.d.R. lediglich Effekte eines durch potentiell artifizielle Transfektion fremder Nukleinsäuren (siRNA, Expressionsplasmide) vorübergehend beeinflussten Expressionsniveaus (*knock-down*, transiente Überexpression) untersucht wurden. Vor diesem Hintergrund ist die in dieser Arbeit verwendete Methodik überlegen. Jedoch bleibt zu berücksichtigen, dass sich die etablierten Zelllinien durch multiple Zellpassagen im Rahmen der Einzelzellklonierung mutmaßlich komplexer als nur hinsichtlich ihrer TRIM9-Expression von dem zugrunde liegenden Wildtyp unterscheiden. Zwar wurden zur Reduktion dadurch entstehender Abweichungen jeweils mehrere Einzelzellklone (Wildtyp wie auch TRIM9-/-) unabhängig voneinander in entsprechende Experimente einbezogen, jedoch bleibt das Grundproblem einer Vergleichbarkeit unterschiedlicher Zellklone bestehen. Neben der Einzelzellklonierung sind auch mutmaßlich affektierte *off-targets* der CRISPR-Zielsequenz als

Ursache zellklonspezifischer Effekte in Betracht zu ziehen. Trotz ihrer üblichen Verwendung sind ebenso onkogene beziehungsweise immortalisierte Zelllinien kritisch zu betrachten, deren Onkogen-veränderter Zellzyklus sowie Zellmetabolismus sich möglicherweise auf die Virusreplikation auswirkt.

4.3 Ausblick

Weiterführende Arbeiten werden zeigen, ob sich Effekte einer stabilen TRIM9-Defizienz durch retrovirale Wiedereinbringung von TRIM9 rekonstituieren lassen. Sollten sich auf diesem Weg die hier demonstrierten Auswirkungen der TRIM9-Expression bestätigen lassen, ist weiterführend die Identifikation dafür verantwortlicher Molekularmechanismen sowie in diesem Zusammenhang die Identifikation mit TRIM9 interagierender Proteine von Interesse. Aktuelle Literatur legt zudem nahe, Funktionen der verschiedenen Isoformen von TRIM9 getrennt zu betrachten. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Auswirkung der Wiedereinbringung einzelner Domänen in TRIM9-defiziente Zellen von Interesse, um Rückschlüsse auf die Funktion von Proteindomänen wie beispielsweise die Ubiquitinligasedomäne von TRIM9 ziehen zu können. Weiterhin wird sich zeigen müssen, inwieweit Ergebnisse, die *in vitro* auf Basis onkogener Zelllinien gewonnen wurden, auf entsprechende Mausmodelle übertragbar sind. TRIM9-defiziente Mäuse stellten sich bereits als überlebensfähig heraus. Die Frage, ob diese verglichen mit dem Wildtyp mehr oder weniger suszeptibel gegenüber ssRNA-Virus-Infektionen sind, ist besonders in Anbetracht des folgenden, bisher ungeklärten Widerspruches elementar: Während Ergebnisse dieser Arbeit das die HCV-Chronifizierungswahrscheinlichkeit senkende SNP-Allel mit einer gesteigerten TRIM9-Expression in Verbindung bringen, weisen ssRNA-Viren in TRIM9-defizienten Zellmodellen jedoch eine verminderte Replikationskompetenz auf. Damit bleibt letztlich die Frage zu klären, ob sich TRIM9 *in vivo* als pro- oder antivirales Protein herausstellt.

4.4 Relevanzbeurteilung

Die klinische Relevanz der in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse kann in zweierlei Hinsicht betrachtet werden: Einerseits ist ein klinisch prädiktiver Nutzen sowie eine therapeutische Konsequenz genetischer Polymorphismen, die mit einer veränderten Wahrscheinlichkeit einer HCV-Chronifizierung assoziiert sind, möglich. Andererseits können die dafür verantwortlichen Molekularmechanismen und Proteinfunktionen pharmazeutische Zielstrukturen offenlegen, deren therapeutische Beeinflussung positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf haben könnte.

So ist mit zunehmender Kenntnis über genetische Einflussfaktoren durchaus denkbar, dass zukünftig Therapieentscheidungen im Sinne der personalisierten Medizin auch von der individuellen Genetik abhängen werden. Vor diesem Hintergrund ist auch eine variierende Wirksamkeit verschiedener Therapeutika in der chronischen Hepatitis C in Abhängigkeit von genetischen Polymorphismen denkbar, wie es bereits für Polymorphismen von IL-28B demonstriert werden konnte. Darüber hinaus wäre die Identifikation von Patientengruppen mit sehr hohen beziehungsweise niedrigen Wahrscheinlichkeiten einer Spontanausheilung auch aus gesundheitsökonomischer Perspektive in-

teressant: Selbst in wohlhabenden Ländern der westlichen Welt wurden zuletzt intensive Diskussionen über die gesellschaftliche Berechtigung überhöhter Preise neuartiger Hepatitis-C-Therapeutika wie „Sovaldi“ geführt, die zwar erstmals eine nachhaltige Heilung in Aussicht stellen, jedoch durch zurückhaltende Bereitschaft der Kostenübernahme seitens der Krankenkassen nur begrenzt einsetzbar sind. Gerade in Ländern niedrigeren Wohlstandes mit häufig höherer Hepatitis-C-Inzidenz wäre vor diesem Hintergrund die Identifikation von Patientengruppen mit genetisch bedingt schlechten Aussichten auf Spontanausheilung sinnvoll, um primär diesen - soweit ethisch vertretbar - begrenzte therapeutische Ressourcen zukommen zu lassen.

Darüber hinaus legen Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die TRIM9-Expression nicht nur regulativen Einfluss auf den Verlauf einer HCV-Infektion ausübt, sondern Infektionen mit diversen ssRNA-Viren beeinflusst. Zwar konnte der dafür verantwortliche Molekularmechanismus bisher nicht aufgedeckt werden. Dass es sich jedoch insbesondere nicht um einen HCV-spezifischen Effekt handelt, lässt dessen weitere Erforschung als lohnenswert erscheinen. Einerseits deutet die klinische Assoziationsstudie, die den SNP in der TRIM9-3'UTR mit der HCV-Chronifizierung in Zusammenhang brachte, auf eine klinische Relevanz hin. Andererseits deuten die *In-vitro*-Ergebnisse dieser Arbeit an, dass durch den SNP keine eigentliche Proteinfunktion moduliert wird, sondern die Expression eines Proteins variiert wird, was sich auf die Replikation diverser ssRNA-Viren auswirkt. Sollte sich dieser Zusammenhang in weiteren Studien bestätigen und sich der dafür verantwortliche Molekularmechanismus identifizieren lassen, erhöht dies das Interesse an TRIM9 als potentieller pharmazeutischer Zielstruktur: Wäre eine pharmazeutische Inhibition von TRIM9 als antivirale Therapiestrategie denkbar? Neben viralen Proteinen wie beispielsweise viralen Nukleinsäurepolymerasen, die direkt inhibiert oder indirekt durch Nukleosidanaloga angesprochen als pharmazeutische Zielstrukturen diverser Virostatika dienen, kommen grundsätzlich ebenso Wirtszellproteine als Zielstruktur in Betracht, deren Inhibition oder Funktionsmodulation die parasitäre Ausnutzung des Wirtszellmetabolismus durch Viren erschwert. Wirtszellprotein-inhibierende HCV-Medikamente, deren antivirale Wirkungen bereits evaluiert wurden, sind beispielsweise Alisporivir (Inhibition von Cyclophilin) oder Merimepodib (Inhibition der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase) [Gallay and Lin, 2013; Marcellin et al., 2007]. Zwar ist deren Bedeutung durch die Einführung neuartiger HCV-Therapeutika wie Sofosbuvir in den Hintergrund gerückt, das Interesse an breit antiviral wirkenden Medikamenten bleibt jedoch vor dem Hintergrund anderer Viruserkrankungen bestehen. Ob sich eine Inhibition von TRIM9 als antivirale Therapiestrategie anbietet, werden weitere umfangreiche Studien zeigen müssen. Dass transgene TRIM9-defiziente Mäuse einerseits überlebensfähig sind und andererseits keinen bisher offensichtlichen, pathologischen Phänotyp zeigen, legt jedoch nahe, dass eine therapeutische Inhibition von TRIM9 nicht zur Einschränkung überlebensnotwendiger Wirtszellfunktionen führen würde.

5 Zusammenfassung

Einleitung – Die *Tripartite-motif*-Proteinfamilie (TRIM) umfasst mehr als 70 E3-Ubiquitin-Ligasen, die in diverse zelluläre Prozesse involviert sind. Für verschiedene TRIM-Proteine wurden in den letzten Jahren Funktionen in der angeborenen antiviralen Immunität beschrieben. Durch eine Kooperationsgruppe konnten die Allele des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs12879906 in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) von TRIM9 mit differentiellen Chronifizierungswahrscheinlichkeiten einer Hepatitis-C-Virus-Infektion (HCV-Infektion) assoziiert werden. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss des SNPs rs12879906 auf die posttranskriptionelle Regulation von TRIM9 und analysiert *in vitro* die Bedeutung von TRIM9 für die angeborene Immunität gegen ssRNA-Virus-Infektionen.

Methodik – Der Einfluss der TRIM9-3'UTR sowie des dort lokalisierten SNPs rs12879906 auf die Expression des 5'-gelegenen Gens wurde durch Reporter-*assays* quantifiziert. Mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung sowie retroviraler Transduktion wurden TRIM9-defiziente sowie TRIM9-überexprimierende Zelllinien etabliert. In diesen wurde der Einfluss der TRIM9-Expression auf die Replikation verschiedener ssRNA-Viren mittels Durchflusszytometrie, qRT-PCR sowie TCID₅₀-Endpunktverdünnungs-*assays* bestimmt. Neben Virusinfektionen wurden synthetische Liganden zur Aktivierung antiviraler Mustererkennungsrezeptoren verwendet und resultierende Zytokinantworten in Abhängigkeit der TRIM9-Expression mittels ELISA sowie qRT-PCR charakterisiert. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wurde durch Luciferase-basierte Reporter-*assays* quantifiziert.

Ergebnisse – In Reporter-*assays* zeigte sich, dass die Allele des SNP rs12879906 in der TRIM9-3'UTR in der Tat das Expressionsniveau des 5'-gelegenen Gens und damit mutmaßlich die endogene TRIM9-Expression differentiell beeinflussen. Das A/T-Allel führte dabei zu einer gesteigerten Proteinexpression. Verschiedene ssRNA-Viren positiver (Gelbfieber-Impfvirus, *Semliki-forest*-Virus, Enzephalomyokarditis-Virus) wie negativer (*Vesicular-Stomatitis*-Virus; VSV) Polarität replizierten in TRIM9-defizienten Zellen signifikant langsamer als in korrespondierenden Wildtypzellen. Infektionen mit dem (-)ssRNA-Virus VSV induzierten dabei in TRIM9-defizienten Zellen gemessen an der Interferon- und Zytokinproduktion sowie der Induktion Interferon-responsiver Gene eine verminderte Immunantwort. Infektionen mit (+)ssRNA-Viren führten in TRIM9-defizienten Zellen dagegen trotz supprimierter Virusreplikation zu einer gesteigerten Zytokinantwort. Auch die Transfektion von RNA-Isolaten HCV-infizierter Zellen induzierte in Abwesenheit von TRIM9 eine gesteigerte Zytokinantwort. TLR3-induzierte Immunantworten stellten sich in TRIM9-defizienten Zellen gegenüber dem Wildtyp als gesteigert dar, während die durch Aktivatoren RIG-I-ähnlicher-Helikasen induzierten Immunantworten durch das Fehlen oder die Überexpression von TRIM9 unbeeinflusst blieben. Konsistent mit aktueller Literatur zeigte sich in Reporter-*assays* ein inhibitorischer Effekt von TRIM9 auf die Induktion von NF- κ B.

Schlussfolgerung und Ausblick – Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass die TRIM9-Expression durch den SNP rs12879906 beeinflusst wird, dessen Allele sich ebenso mit differentiellen Ausheilungswahrscheinlichkeiten nach einer HCV-Infektion assoziieren ließen. *Loss-of-function*- sowie Überexpressionsexperimente demonstrieren eine provirale Funktion von TRIM9 für ssRNA-Viren.

Ob die provirale Funktion von TRIM9 dabei über eine direkte Beeinflussung des viralen Replikationszyklus oder indirekt über die Modulation der induzierten Immunantwort vermittelt wird konnte noch nicht abschließend geklärt werden und unterscheidet sich möglicherweise zwischen Infektionen mit ssRNA-Viren positiver und negativer Polarität. Zusammenfassend legen die *In-vitro*-Daten dieser Arbeit eine modulierende Funktion von TRIM9 in der antiviralen Immunität nahe. Weiterführende Studien sind notwendig, um die dafür verantwortlichen Molekularmechanismen aufzudecken. Dabei ist neben der Aufklärung, welche Proteindomänen von TRIM9 für den Effekt benötigt werden, insbesondere die Identifikation der molekularen Interaktionspartner von TRIM9 von Interesse und Gegenstand weiterführender Untersuchungen.

6 Summary

Introduction – The tripartite motif family (TRIM) protein 9 belongs to the TRIM protein family comprising more than 70 E3 ubiquitin ligases that have been described to be involved in a variety of cellular processes. In a genome-wide association study a cooperating research group recently identified a single nucleotide polymorphism (SNP) in the 3'-untranslated-region (3'UTR) of TRIM9 to be associated with the outcome of hepatitis C virus (HCV) infection. Here, we aim to clarify if the alleles of SNP rs12879906 affect the posttranscriptional regulation of TRIM9 and analyse by functional assays *in vitro* the influence of TRIM9 expression on the innate antiviral immunity against ssRNA-virus infections.

Methodology – Luciferase reporter assays containing the 3'UTR of TRIM9 were used to test the effect of the SNP-alleles on the expression of the 5'-located gene. Using CRISPR/Cas9 genome editing and retroviral transduction, celllines deficient in TRIM9 and stably overexpressing TRIM9 respectively were generated. These celllines were used for *in vitro* infection assays considering a variety of different ssRNA-viruses. Viral replication was quantified by TCID50 endpoint dilution assays, by qRT-PCR as well as by flow cytometry using fluorescent protein expressing virus strains. Additionally to viral infections, synthetic ligands were used to specifically activate different innate immune receptors (RIG-I, MDA5, TLR3, Type-I-Interferon-receptor). Resulting immune responses were characterized measuring secreted cytokines (IP-10, IL-6, TNF- α) by ELISA and the induction of proinflammatory genes by qRT-PCR. The induction of transcription factors was evaluated using luciferase-based reporter assays.

Results – We could demonstrate that the SNP-alleles of rs12879906 in the TRIM9 3'UTR indeed affect the expression of the 5'-located gene with the A/T-allele leading to higher amounts of protein. Loss of TRIM9 significantly inhibited the viral replication of a variety of positive-stranded (yellow fever virus 17D, semliki forest virus, encephalomyocarditis virus) as well as negative-stranded (vesicular stomatitis virus; VSV) ssRNA-viruses. Infection with the (-)ssRNA-virus VSV thereby induced a diminished immune response in TRIM9 deficient cells measured by the production of cytokines and induction of interferon-induced genes. In contrast infection with (+)ssRNA-viruses induced an enhanced cytokine response in TRIM9 deficient cells. Similarly the transfection of RNA isolated from HCV-infected cells led to an enhanced cytokine production. TLR-3 mediated immune responses were augmented in TRIM9 deficient cells while loss of TRIM9 had no consistent influence on RIG-I-like-helicase-mediated immune responses. In accordance to recently published literature, we found an inhibitory effect of TRIM9 on the activation of NF- κ B.

Conclusion and Outlook – Our data suggest that the TRIM9 expression level is affected by the alleles of SNP rs12879906 in its 3'UTR, that were also found to be associated with an altered HCV clearance. Based on loss of function as well as on overexpression experiments, our data demonstrate a proviral function of TRIM9 for a variety of different ssRNA viruses. Whether this proviral function of TRIM9 is mediated by a direct influence on the viral replication cycle or indirectly by modulating the induced immune response could not be conclusively determined and might actually differ between positive- and negative-stranded viruses. Nevertheless, our *in vitro*

data highly suggest that there is a role of TRIM9 in antiviral immunity and further studies are needed to reveal the underlying molecular mechanisms. Ongoing work focuses on the identification of molecular targets of TRIM9 and on the identification of those domains of TRIM9 that are required for its impact on ssRNA-virus infections.

APPENDIX

Verzeichnis der Literatur

- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. Cell, 124:783–801.
- Alonso, F. V. and Compans, R. W. (1981). Differential effect of monensin on enveloped viruses that form at distinct plasma membrane domains. The Journal of cell biology, 89:700–705.
- Asaoka, K., Ikeda, K., Hishinuma, T., Horie-Inoue, K., Takeda, S., and Inoue, S. (2005). A retrovirus restriction factor TRIM5 α is transcriptionally regulated by interferons. Biochemical and biophysical research communications, 338:1950–1956.
- Baltimore, D. (1971). Expression of animal virus genomes. Bacteriological reviews, 35:235–241.
- Barr, S. D., Smiley, J. R., and Bushman, F. D. (2008). The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22. PLoS pathogens, 4:e1000007.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science (New York, N.Y.), 315:1709–1712.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116:281–297.
- Bos, L. (1999). Beijerinck’s work on tobacco mosaic virus: historical context and legacy. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 354:675–685.
- Carrero, J. A. (2013). Confounding roles for type I interferons during bacterial and viral pathogenesis. International immunology, 25:663–669.
- Carthagen, L., Bergamaschi, A., Luna, J. M., David, A., Uchil, P. D., Margottin-Goguet, F., Mothes, W., Hazan, U., Transy, C., Pancino, G., and Nisole, S. (2009). Human TRIM gene expression in response to interferons. PloS one, 4:e4894.
- Chelbi-Alix, M. K., Quignon, F., Pelicano, L., Koken, M. H., and de Thé, H. (1998). Resistance to virus infection conferred by the interferon-induced promyelocytic leukemia protein. Journal of virology, 72:1043–1051.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339:819–823.
- Cuchet, D., Sykes, A., Nicolas, A., Orr, A., Murray, J., Sirma, H., Heeren, J., Bartelt, A., and Everett, R. D. (2011). PML isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication. Journal of cell science, 124:280–291.
- Davis, M. E. and Gack, M. U. (2015). Ubiquitination in the antiviral immune response. Virology, 479-480:52–65.

- Desai, S. D., Haas, A. L., Wood, L. M., Tsai, Y.-C., Pestka, S., Rubin, E. H., Saleem, A., Nur-E-Kamal, A., and Liu, L. F. (2006). Elevated expression of ISG15 in tumor cells interferes with the ubiquitin/26S proteasome pathway. Cancer research, 66:921–928.
- Diaz-Griffero, F., Li, X., Javanbakht, H., Song, B., Welikala, S., Stremlau, M., and Sodroski, J. (2006). Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5. Virology, 349:300–315.
- Furr, S. R., Moerdyk-Schauwecker, M., Grdzlishvili, V. Z., and Marriott, I. (2010). RIG-I mediates nonsegmented negative-sense RNA virus-induced inflammatory immune responses of primary human astrocytes. Glia, 58:1620–1629.
- Gack, M. U., Kirchhofer, A., Shin, Y. C., Inn, K.-S., Liang, C., Cui, S., Myong, S., Ha, T., Hopfner, K.-P., and Jung, J. U. (2008). Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105:16743–16748.
- Gack, M. U., Shin, Y. C., Joo, C.-H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., and Jung, J. U. (2007). TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. Nature, 446:916–920.
- Gallay, P. A. and Lin, K. (2013). Profile of alisporivir and its potential in the treatment of hepatitis C. Drug design, development and therapy, 7:105–115.
- Geng, P.-L., Song, L.-X., An, H., Huang, J.-Y., Li, S., and Zeng, X.-T. (2016). Toll-Like Receptor 3 is Associated With the Risk of HCV Infection and HBV-Related Diseases. Medicine, 95:e2302.
- Genin, P., Morin, P., and Civas, A. (2003). Impairment of interferon-induced IRF-7 gene expression due to inhibition of ISGF3 formation by trichostatin A. Journal of virology, 77:7113–7119.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. Annual review of immunology, 16:225–260.
- Gonzalez Plaza, J. J., Hulak, N., Kausova, G., Zhumadilov, Z., and Akilzhanova, A. (2016). Role of metabolism during viral infections, and crosstalk with the innate immune system. Intractable & rare diseases research, 5:90–96.
- Goubau, D., Deddouche, S., and Reis e Sousa, C. (2013). Cytosolic sensing of viruses. Immunity, 38:855–869.
- Grebely, J., Raffa, J. D., Lai, C., Krajden, M., Conway, B., and Tyndall, M. W. (2007). Factors associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus among illicit drug users. Canadian journal of gastroenterology, 21:447–451.
- Gross, C. P. and Sepkowitz, K. A. (1998). The myth of the medical breakthrough: smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. International journal of infectious diseases, 3:54–60.
- Hierholzer and Killington (1996). Virology Methods Manual. Academic Press Inc, Seite 374.

- Hiscott, J., Alper, D., Cohen, L., Leblanc, J. F., Sportza, L., Wong, A., and Xanthoudakis, S. (1989). Induction of human interferon gene expression is associated with a nuclear factor that interacts with the NF-kappa B site of the human immunodeficiency virus enhancer. Journal of virology, 63:2557–2566.
- Hiscott, J., Kwon, H., and Génin, P. (2001). Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kappaB pathway. The Journal of clinical investigation, 107:143–151.
- Hiscott, J., Marois, J., Garoufalidis, J., D’Addario, M., Roulston, A., Kwan, I., Pepin, N., Lacoste, J., Nguyen, H., and Bensi, G. (1993). Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. Molecular and cellular biology, 13:6231–6240.
- Hoffmann, F. S., Schmidt, A., Dittmann Chevillotte, M., Wisskirchen, C., Hellmuth, J., Willms, S., Gilmore, R. H., Glas, J., Folwaczny, M., Müller, T., Berg, T., Spengler, U., Fitzmaurice, K., Kelleher, D., Reisch, N., Rice, C. M., Endres, S., and Rothenfusser, S. (2015). Polymorphisms in melanoma differentiation-associated gene 5 link protein function to clearance of hepatitis C virus. Hepatology, 61:460–470.
- Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A., and Taniguchi, T. (2005). Regulation of the type I IFN induction: a current view. International immunology, 17:1367–1378.
- Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzózka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.-K., Schlee, M., Endres, S., and Hartmann, G. (2006). 5’-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. Science, 314:994–997.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell, 157:1262–1278.
- Huang, Y., Yang, H., Borg, B. B., Su, X., Rhodes, S. L., Yang, K., Tong, X., Tang, G., Howell, C. D., Rosen, H. R., Thio, C. L., Thomas, D. L., Alter, H. J., Sapp, R. K., and Liang, T. J. (2007). A functional SNP of interferon-gamma gene is important for interferon-alpha-induced and spontaneous recovery from hepatitis C virus infection. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104:985–990.
- Huesser, L., Alves, M. P., Ruggli, N., and Summerfield, A. (2011). Identification of the role of RIG-I, MDA-5 and TLR3 in sensing RNA viruses in porcine epithelial cells using lentivirus-driven RNA interference. Virus research, 159:9–16.
- Isaacs, A. and Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 147:258–267.
- Ishikawa, H., Tachikawa, H., Miura, Y., and Takahashi, N. (2006). TRIM11 binds to and destabilizes a key component of the activator-mediated cofactor complex (ARC105) through the ubiquitin-proteasome system. FEBS letters, 580:4784–4792.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. Journal of bacteriology, 169:5429–5433.

- Jansen, R., Embden, J. D. A. v., Gastra, W., and Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Molecular microbiology, 43:1565–1575.
- Javanbakht, H., Yuan, W., Yeung, D. F., Song, B., Diaz-Griffero, F., Li, Y., Li, X., Stremlau, M., and Sodroski, J. (2006). Characterization of TRIM5 α trimerization and its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding. Virology, 353:234–246.
- Kääriäinen, L., Hashimoto, K., Saraste, J., Virtanen, I., and Penttinen, K. (1980). Monensin and FCCP inhibit the intracellular transport of alphavirus membrane glycoproteins. The Journal of cell biology, 87:783–791.
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., and Weissman, D. (2004). mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. The Journal of biological chemistry, 279:12542–12550.
- Karin, M., Cao, Y., Greten, F. R., and Li, Z.-W. (2002). NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. Nature reviews. Cancer, 2:301–310.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of rig-i in antiviral response. Immunity, 23:19–28.
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., and Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. Nature, 441:101–105.
- Kawasaki, T., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. Immunological reviews, 243:61–73.
- Kim, G. N. and Kang, C. Y. (2007). Matrix protein of VSV New Jersey serotype containing methionine to arginine substitutions at positions 48 and 51 allows near-normal host cell gene expression. Virology, 357:41–53.
- Kunsch, C. and Rosen, C. A. (1993). NF- κ B subunit-specific regulation of the interleukin-8 promoter. Molecular and cellular biology, 13:6137–6146.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell, 75:843–854.
- Lehmann, M., Meyer, M. F., Monazahian, M., Tillmann, H. L., Manns, M. P., and Wedemeyer, H. (2004). High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection. Journal of medical virology, 73:387–391.
- Lenardo, M. J., Fan, C. M., Maniatis, T., and Baltimore, D. (1989). The involvement of NF- κ B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. Cell, 57:287–294.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96:11364–11369.

- Lu, R., Au, W. C., Yeow, W. S., Hageman, N., and Pitha, P. M. (2000). Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. Activation by interferon and silencing by hypermethylation. The Journal of biological chemistry, 275:31805–31812.
- Mali, P., Aach, J., Stranges, P. B., Esvelt, K. M., Moosburner, M., Kosuri, S., Yang, L., and Church, G. M. (2013). CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. Nature biotechnology, 31:833–838.
- Manna, S. K. and Aggarwal, B. B. (2000). All-trans-retinoic acid upregulates TNF receptors and potentiates TNF-induced activation of nuclear factors-kappaB, activated protein-1 and apoptosis in human lung cancer cells. Oncogene, 19:2110–2119.
- Marcellin, P., Horsmans, Y., Nevens, F., Grange, J.-D., Bronowicki, J.-P., Vetter, D., Purdy, S., Garg, V., Bengtsson, L., McNair, L., and Alam, J. (2007). Phase 2 study of the combination of merimepodib with peginterferon-alpha2b, and ribavirin in nonresponders to previous therapy for chronic hepatitis C. Journal of hepatology, 47:476–483.
- Micallef, J. M., Kaldor, J. M., and Dore, G. J. (2006). Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. Journal of viral hepatitis, 13:34–41.
- Mojica, F. J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., and Juez, G. (2000). Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. Molecular microbiology, 36:244–246.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. Journal of molecular evolution, 60:174–182.
- Narayan, K., Waggoner, L., Pham, S. T., Hendricks, G. L., Waggoner, S. N., Conlon, J., Wang, J. P., Fitzgerald, K. A., and Kang, J. (2014). TRIM13 is a negative regulator of MDA5-mediated type I interferon production. Journal of virology, 88:10748–10757.
- Nazmi, A., Dutta, K., Hazra, B., and Basu, A. (2014). Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. Virus research, 185:32–40.
- Nisole, S., Stoye, J. P., and Saïb, A. (2005). TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. Nature reviews. Microbiology, 3:799–808.
- Ohmori, Y. and Hamilton, T. A. (1993). Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP-10 promoter. The Journal of biological chemistry, 268:6677–6688.
- Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H., and Morse, H. C. (2008). Trim family proteins and their emerging roles in innate immunity. Nature reviews. Immunology, 8:849–860.

- Pichlmair, A., Schulz, O., Tan, C.-P., Rehwinkel, J., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Way, M., Schiavo, G., and Reis e Sousa, C. (2009). Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. Journal of virology, 83:10761–10769.
- Pourcel, C., Salvignol, G., and Vergnaud, G. (2005). CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. Microbiology, 151:653–663.
- Qin, Y., Liu, Q., Tian, S., Xie, W., Cui, J., and Wang, R.-F. (2016). TRIM9 short isoform preferentially promotes DNA and RNA virus-induced production of type I interferon by recruiting GSK3 β to TBK1. Cell research, 26:613–628.
- Querec, T. D., Akondy, R. S., Lee, E. K., Cao, W., Nakaya, H. I., Teuwen, D., Pirani, A., Gernert, K., Deng, J., Marzolf, B., Kennedy, K., Wu, H., Bennouna, S., Oluoch, H., Miller, J., Vencio, R. Z., Mulligan, M., Aderem, A., Ahmed, R., and Pulendran, B. (2009). Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. Nature immunology, 10:116–125.
- Rajsbaum, R., Stoye, J. P., and O’Garra, A. (2008). Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. European journal of immunology, 38:619–630.
- Rajsbaum, R., Versteeg, G. A., Schmid, S., Maestre, A. M., Belicha-Villanueva, A., Martinez-Romero, C., Patel, J. R., Morrison, J., Pisanelli, G., Miorin, L., Laurent-Rolle, M., Moulton, H. M., Stein, D. A., Fernandez-Sesma, A., tenOever, B. R., and Garcia-Sastre, A. (2014). Unanchored K48-linked polyubiquitin synthesized by the E3-ubiquitin ligase TRIM6 stimulates the interferon-IKK ϵ kinase-mediated antiviral response. Immunity, 40:880–895.
- Regad, T., Saib, A., Lallemand-Breitenbach, V., Pandolfi, P. P., de Thé, H., and Chelbi-Alix, M. K. (2001). PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator. The EMBO journal, 20:3495–3505.
- Rehwinkel, J., Tan, C. P., Goubau, D., Schulz, O., Pichlmair, A., Bier, K., Robb, N., Vreede, F., Barclay, W., Fodor, E., and Reis e Sousa, C. (2010). RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. Cell, 140:397–408.
- Rosa, P., Mantovani, S., Rosboch, R., and Huttner, W. B. (1992). Monensin and brefeldin A differentially affect the phosphorylation and sulfation of secretory proteins. The Journal of biological chemistry, 267:12227–12232.
- Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B. G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S., and Fitzgerald, K. A. (2005). The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. Journal of immunology, 175:5260–5268.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Luppa, P., Lipford, G. B., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. European journal of immunology, 34:2541–2550.

- Sakuma, R., Noser, J. A., Ohmine, S., and Ikeda, Y. (2007). Rhesus monkey TRIM5 α restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins. Nature medicine, 13:631–635.
- Samson, J. E., Magadán, A. H., Sabri, M., and Moineau, S. (2013). Revenge of the phages: defeating bacterial defences. Nature reviews. Microbiology, 11:675–687.
- Sanda, T., Iida, S., Ogura, H., Asamitsu, K., Murata, T., Bacon, K. B., Ueda, R., and Okamoto, T. (2005). Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I κ B kinase inhibitor. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 11:1974–1982.
- Savarino, A., Boelaert, J. R., Cassone, A., Majori, G., and Cauda, R. (2003). Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today’s diseases? The Lancet. Infectious diseases, 3:722–727.
- Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J. C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F. S., Michallet, M.-C., Besch, R., Hopfner, K.-P., Endres, S., and Rothenfusser, S. (2009). 5’-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 106:12067–12072.
- Schulz, O., Pichlmair, A., Rehwinkel, J., Rogers, N. C., Scheuner, D., Kato, H., Takeuchi, O., Akira, S., Kaufman, R. J., and Reis e Sousa, C. (2010). Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. Cell host & microbe, 7:354–361.
- Schütt, C. and Bröker, B. (2009). Grundwissen Immunologie, 2. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.
- Sebastian, S. and Luban, J. (2005). TRIM5 α selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid. Retrovirology, 2:40.
- Shakhov, A. N., Collart, M. A., Vassalli, P., Nedospasov, S. A., and Jongeneel, C. V. (1990). Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. The Journal of experimental medicine, 171:35–47.
- Shi, M., Cho, H., Inn, K.-S., Yang, A., Zhao, Z., Liang, Q., Versteeg, G. A., Amini-Bavil-Olyaei, S., Wong, L.-Y., Zlokovic, B. V., Park, H.-S., García-Sastre, A., and Jung, J. U. (2014). Negative regulation of NF- κ B activity by brain-specific TRIPartite Motif protein 9. Nature communications, 5:4820.
- Shi, M., Deng, W., Bi, E., Mao, K., Ji, Y., Lin, G., Wu, X., Tao, Z., Li, Z., Cai, X., Sun, S., Xiang, C., and Sun, B. (2008). TRIM30 α negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation. Nature immunology, 9:369–377.
- Shintani, T. and Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. Science (New York, N.Y.), 306:990–995.

- Short, K. M. and Cox, T. C. (2006). Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. The Journal of biological chemistry, 281:8970–8980.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2009). Innate immunity to virus infection. Immunological reviews, 227:75–86.
- Takeuchi, O. and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. Cell, 140:805–820.
- Tanji, K., Kamitani, T., Mori, F., Kakita, A., Takahashi, H., and Wakabayashi, K. (2010). TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson’s disease and dementia with Lewy bodies. Neurobiology of disease, 38:210–218.
- Tartakoff, A., Vassalli, P., and Détraz, M. (1978). Comparative studies of intracellular transport of secretory proteins. The Journal of cell biology, 79:694–707.
- Tartakoff, A. M. (1983). Perturbation of vesicular traffic with the carboxylic ionophore monensin. Cell, 32:1026–1028.
- Taylor, K. E. and Mossman, K. L. (2013). Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon. Immunology, 138:190–197.
- Taylor, R. T., Lubick, K. J., Robertson, S. J., Broughton, J. P., Bloom, M. E., Bresnahan, W. A., and Best, S. M. (2011). TRIM79 α , an interferon-stimulated gene product, restricts tick-borne encephalitis virus replication by degrading the viral RNA polymerase. Cell host & microbe, 10:185–196.
- Thomas, D. L., Thio, C. L., Martin, M. P., Qi, Y., Ge, D., O’Huigin, C., Kidd, J., Kidd, K., Khakoo, S. I., Alexander, G., Goedert, J. J., Kirk, G. D., Donfield, S. M., Rosen, H. R., Tobler, L. H., Busch, M. P., McHutchison, J. G., Goldstein, D. B., and Carrington, M. (2009). Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. Nature, 461:798–801.
- Trockenbacher, A., Suckow, V., Foerster, J., Winter, J., Krauss, S., Ropers, H. H., Schneider, R., and Schweiger, S. (2001). MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. Nature genetics, 29:287–294.
- Turelli, P., Doucas, V., Craig, E., Mangeat, B., Klages, N., Evans, R., Kalpana, G., and Trono, D. (2001). Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication. Molecular cell, 7:1245–1254.
- Uchil, P. D., Quinlan, B. D., Chan, W.-T., Luna, J. M., and Mothes, W. (2008). TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle. PLoS pathogens, 4:e16.
- Vercammen, E., Staal, J., and Beyaert, R. (2008). Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3. Clinical microbiology reviews, 21:13–25.
- Versteeg, G. A., Rajsbaum, R., Sánchez-Aparicio, M. T., Maestre, A. M., Valdiviezo, J., Shi, M., Inn, K.-S., Fernandez-Sesma, A., Jung, J., and García-Sastre, A. (2013). The E3-ligase TRIM

- family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. Immunity, 38:384–398.
- Vincent, M. J., Bergeron, E., Benjannet, S., Erickson, B. R., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Seidah, N. G., and Nichol, S. T. (2005). Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread. Virology journal, 2:69. Original DateCompleted: 20051021.
- Voltaire (1733). Lettres philosophiques. 2, 2(1):384–398. Projektantrag für FöFoLe-Programm.
- Weber, F., Wagner, V., Rasmussen, S. B., Hartmann, R., and Paludan, S. R. (2006). Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. Journal of virology, 80:5059–5064.
- Wesolowski, J. and Paumet, F. (2010). SNARE motif: a common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion. Virulence, 1:319–324.
- Wiese, M., Fischer, J., Löbermann, M., Göbel, U., Grüngreiff, K., Güthoff, W., Kullig, U., Richter, F., Schiefke, I., Tenckhoff, H., Zipprich, A., Berg, T., Müller, T., and Group, E. G. H. S. (2014). Evaluation of liver disease progression in the German hepatitis C virus (1b)-contaminated anti-D cohort at 35 years after infection. Hepatology, 59:49–57.
- Winkle, C. C., McClain, L. M., Valtschanoff, J. G., Park, C. S., Maglione, C., and Gupton, S. L. (2014). A novel Netrin-1-sensitive mechanism promotes local SNARE-mediated exocytosis during axon branching. The Journal of cell biology, 205:217–232.
- Yan, J., Li, Q., Mao, A.-P., Hu, M.-M., and Shu, H.-B. (2014). TRIM4 modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting RIG-I for K63-linked ubiquitination. Journal of molecular cell biology, 6:154–163.
- Yan, N. and Chen, Z. J. (2012). Intrinsic antiviral immunity. Nature immunology, 13:214–222.
- Yang, B., Wang, J., Wang, Y., Zhou, H., Wu, X., Tian, Z., and Sun, B. (2013). Novel function of Trim44 promotes an antiviral response by stabilizing VISA. Journal of immunology, 190:3613–3619.
- Yang, K., Shi, H.-X., Liu, X.-Y., Shan, Y.-F., Wei, B., Chen, S., and Wang, C. (2009). TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response. Journal of immunology, 182:3782–3792.
- Yang, Z.-Y., Huang, Y., Ganesh, L., Leung, K., Kong, W.-P., Schwartz, O., Subbarao, K., and Nabel, G. J. (2004). pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN. Journal of virology, 78:5642–5650.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nature immunology, 5:730–737.

Yoneyama, M., Suhara, W., Fukuhara, Y., Sato, M., Ozato, K., and Fujita, T. (1996). Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). Journal of biochemistry, 120:160–169.

Verzeichnis der Abbildungen

1.1.1	Die Einteilung von Viren nach der Baltimore-Klassifikation berücksichtigt neben der Art der viralen Nukleinsäuren ebenso die resultierenden Wege der viralen Proteinbiosynthese.	3
1.1.2	RLR- sowie TLR-induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren	5
1.2.1	Klassifikation der TRIM-Proteinfamilie	7
1.2.2	TRIM9 wird durch alternatives Spleißen nach Qin et al. in zwei verschiedenen Isoformen exprimiert	9
1.2.3	Aktuelles Erklärungsmodell: Beeinflussung der Aktivierung von NF- κ B und IRF3 durch die kurze sowie lange Isoform von TRIM9 im Rahmen von Virusinfektionen.	10
1.3.1	Ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) in der TRIM9-3'UTR ist mit einem differentiellen Ausgang einer HCV-Infektion assoziiert	12
2.2.1	Schematische Darstellung des CRISPR/Cas-Systems als bakterielles, adaptives Immunsystem.	29
2.2.2	Schematische Darstellung des IFN- β -Promotors mit Bindungsstellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren.	33
2.2.3	Das Reporterplasmid „6x NF- κ B“ zeigt eine hohe Basalexpression der <i>Firefly</i> -Luciferase, wodurch der Effekt der TNF- α -Stimulation geschmälert wird.	33
2.2.4	Schematische Darstellung der die TRIM9-3'UTR enthaltenden Reporterplasmide.	35
2.2.5	Exemplarische Illustration des T7-Endonuklease- <i>screenings</i> einiger 1205Lu-CRISPR-Klone.	40
3.1.1	Der Einzelnukleotidpolymorphismus rs12879906 in der 3'UTR beeinflusst die Genexpression der 5'-lokalisierten, kodierenden Region von TRIM9	44
3.1.2	Die Zugabe von Chloroquin zum Zellmedium blockiert die TLR3-vermittelte Immunantwort.	46
3.1.3	Die Zugabe von 25 μ M Chloroquin vor der Transfektion von HMW pI:C reduziert die Immunantwort durch Blockade von TLR3 und erhöht damit die MDA5-Spezifität der Stimulation.	46
3.1.4	Die TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene wird nach Stimulation mit Interferon- β sowie der Aktivierung von TLR3 vermindert.	47
3.1.5	Die TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene wird durch die Stimulation von RIG-I sowie MDA5 nicht eindeutig beeinflusst.	47
3.1.6	Die Stimulation mit rekombinantem Interferon- γ führt zu einer geringfügigen Suppression der TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene.	48
3.1.7	Darstellung der Stimulationseffizienzen der in Abb. 3.1.8 verwendeten Stimulationskonditionen: Die Transfektion von 3pRNA sowie die Infektion mit VSV-M51R induziert die Sekretion von IP-10 (A). Die Stimulation mit TNF- α oder PMA aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B (B). Die Stimulation mit rekombinantem Interferon- β und Interferon- γ führt zu einer Aktivierung des ISRE-Promotors (C-D).	49
3.1.8	Interferon- γ hemmt über die 3'UTR posttranskriptionell die Expression von TRIM9 unabhängig davon, welches SNP-Allel an rs12879906 vorliegt.	50

3.2.1	Zelllinie 1205Lu: Nachweis des <i>knock-outs</i> von TRIM9 auf Proteinebene.	53
3.2.2	Die TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellklone weisen im Wildtypvergleich ein deutlich reduziertes TRIM9-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene auf.	54
3.2.3	Der TRIM9-defiziente 1205Lu-Klon 4 zeigt in der Sequenzierung auf beiden Allelen dieselbe Deletion von 47 Basenpaaren.	54
3.2.4	Die TRIM9-defizienten 1205Lu-Klone 1,2,3,5 weisen einen vollständigen Verlust der Wildtypsequenz auf.	55
3.2.5	Zelllinie A549: Nachweis des <i>knock-outs</i> von TRIM9 auf Protein- und mRNA-Ebene.	56
3.2.6	TRIM9-defiziente A549-Klone: Klon 2 weist einen vollständigen Verlust der Wildtypsequenz auf; Klon 1 weist noch verbliebene Wildtypsequenz bei Hinweisen auf eine Polyploidie auf.	57
3.2.7	Die klonale Zelllinie A549-TRIM9-CRISPR-32 weist nach stattgehabter Geneditierung mittels CRISPR/Cas9 ein positives T7-Endonuklease-Mutations- <i>screening</i> bei noch detektierbarem TRIM9 im <i>immunoblot</i> auf und wird als zusätzliche Kontrolle in späteren Experimenten verwendet.	57
3.2.8	Zelllinie Huh7.5: Nachweis eines reduzierten TRIM9-Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene bei noch detektierbarer Proteinexpression für den Huh7.5-pKO-Klon 1 im Wildtypvergleich.	58
3.2.9	Nachweis einer Leserasterverschiebung auf einem Allel des Huh7.5-TRIM9-pKO-Klons 1 bei noch verbliebener Wildtypsequenz.	59
3.2.10	Die TRIM9-Überexpressionsklone der Zelllinien HEK293, A549 und Huh7.5 weisen im Wildtypvergleich sowohl eine intensivierte Bande im <i>immunoblot</i> als auch ein gesteigertes TRIM9-Expressionsniveau auf mRNA-Ebene auf.	59
3.3.1	VSV repliziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen weniger als in 1205Lu-WT-Zellen.	65
3.3.2	Die Infektion mit VSV induziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen eine geringere Sekretion von IP-10 und IL-6 als in 1205Lu-WT-Zellen.	66
3.3.3	Die Infektion mit Sendai-Virus induziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen eine geringere Sekretion von IP-10 als in 1205Lu-WT-Zellen.	66
3.3.4	Die Expression Interferon-induzierter Gene (ISGs) und inflammatorischer Zytokine wird in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen nach Infektion mit VSV-M51R in geringerem Maße induziert als in 1205Lu-WT-Zellen.	67
3.3.5	Die VSV-Replikation und dadurch bedingte Induktion von IP-10 findet in TRIM9-defizienten A549-Zellen weniger und in TRIM9-überexprimierenden A549-Zellen mehr statt als in A549-WT-Zellen.	68
3.3.6	Der partielle <i>knock-out</i> nur eines Allels von TRIM9 ist mit einer verminderten Replikationsrate von VSV in der Zelllinie Huh7.5 assoziiert.	69
3.3.7	Das immunstimulatorische Potential der isolierten genomischen RNA von VSV ist nicht von der TRIM9-Expression beeinflusst.	70
3.3.8	Die transiente Überexpression der langen TRIM9-Isoform hat in der Zelllinie A549 einen inhibitorischen Effekt auf die Virusreplikation von VSV und führt zu einer gesteigerten prä- und postinfektiösen Sekretion von IP-10.	72

3.3.9	Fluoreszenzmarkiertes TRIM9l hat bei transienter Überexpression sowohl ein streifenförmiges, möglicherweise mikrotubuliassoziiertes Verteilungsmuster als auch die Form intrazellulär-punktförmiger Verdichtungen. Dabei scheint die N-terminale GFP-Markierung ein punktförmiges und die C-terminale mCherry-Markierung ein streifenförmiges Verteilungsmuster zu begünstigen.	73
3.3.10	TRIM9l ist im Rahmen einer Infektion mit VSV weiterhin in mikrotubuliassoziierten Verteilungsmustern lokalisiert. Es zeigt sich keine Kolo-kalisation von TRIM9 und dem VSV-Phosphoprotein in der Zelllinie HEK293.	74
3.3.11	EMCV und SFV replizieren schlechter in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen und induzieren in ihnen mehr IP-10 als in 1205Lu-WT-Zellen.	76
3.3.12	Das YF-Impf-Virus (YFV) repliziert schlechter in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen und induziert in ihnen mehr IP-10 als in 1205Lu-WT-Zellen.	77
3.3.13	Mengo-Virus kann in der Zelllinie 1205Lu nicht suffizient replizieren. Trotzdem ist eine TRIM9-Defizienz-vermittelte Verstärkung der virusinduzierten Sekretion von IP-10 zu beobachten.	78
3.3.14	Die Transfektion von RNA-Isolaten aus HCV-infizierten Zellen induziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen höhere Mengen an IP-10 als in 1205Lu-Wildtypzellen. . .	79
3.4.1	Die transiente Überexpression von TRIM9l inhibiert die TNF- α - und PMA-induzierte NF- κ B-Aktivierung in der Zelllinie HEK293.	81
3.4.2	Die transiente Überexpression von TRIM9l inhibiert die PMA-induzierte NF- κ B-Aktivierung in der Zelllinie 1205Lu. Der <i>knock-out</i> beider TRIM9-Isoformen wirkt sich gegensätzlich fördernd auf die Aktivierung von NF- κ B aus.	82
3.4.3	Die transiente Überexpression von TRIM9l inhibiert ebenso wie die stabile Überexpression von TRIM9l die PMA-induzierte NF- κ B-Aktivierung in der Zelllinie A549. Der <i>knock-out</i> beider TRIM9-Isoformen wirkt sich gegensätzlich fördernd auf die Aktivierung von NF- κ B aus.	83
3.4.4	Die TRIM9-Defizienz hat keinen signifikanten Einfluss auf die RIG-I-induzierte Sekretion von IP-10.	84
3.4.5	Die TRIM9-Defizienz hat keinen signifikanten Einfluss auf die MDA5-induzierte Sekretion von IP-10.	85
3.4.6	Die TRIM9-Defizienz hat keinen signifikanten Einfluss auf die RIG-I- oder MDA5-induzierte Aktivierung des Interferon- β -Promotors.	86
3.4.7	Die TRIM9-Defizienz zeigt abgesehen von einer verstärkten Induktion von ISG-15 keinen signifikanten Einfluss auf die RIG-I- oder MDA5-induzierte Immunantwort.	87
3.4.8	Die Transfektion von gegen TRIM9 gerichteten siRNAs reduziert die pI:C- und 3pRNA-vermittelte Sekretion von IP-10 in den Zelllinien HEK293, 1205Lu und A549.	89
3.4.9	Die Hemmung der RLR-induzierten Zytokinantwort nach siRNA-vermitteltem <i>knock-down</i> von TRIM9 beruht auf einem TRIM9-unabhängigen Nebeneffekt der siRNAs.	90
3.4.10	TRIM9 fördert die Aktivierung des ISRE-Promotors.	92
3.4.11	Die TRIM9-Defizienz hat keinen signifikanten Einfluss auf die Interferon- β -induzierte Sekretion von IP-10.	93

3.4.12	Die TLR3-vermittelte Sekretion von IP-10 ist in TRIM9-defizienten Zellen verstärkt.	94
3.4.13	Die TRIM9-Defizienz steigert die TLR3-vermittelte Induktion von Interferon- β sowie ISG-54 nach Stimulation mit HMW pI:C.	94
3.4.14	Die TRIM9-Defizienz steigert die Induktion von ISG-15 nach Stimulation von RIG-I, MDA5 sowie TLR3 in den ersten Stunden nach Stimulation.	96
3.5.1	Die Blockade von NF- κ B durch ACHP führt zur partiellen Rekonstitution der durch die TRIM9-Defizienz verursachten Replikationshemmung von VSV.	98
3.5.2	Die Inhibition von TLRs durch Chloroquin zeigt antivirale Effekte, hebt jedoch den Effekt der TRIM9-Defizienz auf die Virusreplikation nicht auf.	100
3.5.3	Monensin inhibiert die VSV-Replikation im Wildtyp, nicht jedoch in TRIM9-defizienten Zellen.	101

Verzeichnis der Abkürzungen

A

ATP	Adenosintriphosphat
ACHP	2-Amino-6-[2-(zyklopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-(4-piperidiny)-3-pyridinecarbonitril

B

BSA	Bovines Serum Albumin
-----	-----------------------

C

cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
------	--------------------------------------

D

DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>

E

EMCV	Enzephalomyokarditis-Virus
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>

F

FSC	<i>Forward scatter</i>
FCS	Fetales Kälberserum

G

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLuc	<i>Gaussia</i> -Luciferase
GFP, eGFP	Grün fluoreszierendes Protein

H

HRP	Meerrettichperoxidase
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HCV	Hepatitis-C Virus

I

ISG	Interferon-stimulierbares Gen
ISRE	<i>Interferon-stimulated response element</i>
IFN- β	Interferon- β
IFN- γ	Interferon- γ
IFNAR	Interferon- α -Rezeptor
IL	Interleukin
IKK	I κ B Kinase

K

KO, -/-	<i>Knock-out</i> auf beiden Allelen
KD	<i>Knock-down</i> (hier mittels siRNA)

M

MDA5	<i>Melanoma differentiation antigen 5</i> , Mitglied der RLRs
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
miRNA	<i>MicroRNA</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>

N

NF- κ B	<i>Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells</i>
----------------	---

O

OE	<i>Overexpression</i> , Überexpression
----	--

P

pKO, +/-	<i>Knock-out</i> auf einem Allel. Wildtypallel(e) verblieben
polyI:C, pI:C, pIC	Polyinosin-Polycytosin-Säure
pppRNA, 3pRNA	Triphosphat-RNA
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaqueformende Einheiten
PPR	<i>Pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>

Q

qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
---------	--

R

RLR	<i>RIG-I-like-</i> , RIG-I-ähnlicher-Rezeptor (RIG-I, MDA5, LGP2)
RNA	Ribonukleinsäure
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i> , Mitglied der RLRs

S

SFV	<i>Semliki-forest-Virus</i>
SeV	Sendai-Virus
SSC	<i>Sideward scatter</i>
SCC	<i>Single cell clone</i> , Einzelzellklon
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotidpolymorphismus
STR	<i>Short tandem repeats</i>
seAP	Sekretorische alkalische Phosphatase
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>

T

TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRIM9l	TRIM9, lange Isoform
TRIM9s	TRIM9, kurze Isoform

U

UTR	Untranslatierte Region
-----	------------------------

V

VSV	<i>Vesicular-stomatitis-Virus</i>
VSV-M51R	<i>Vesicular-stomatitis-Virus</i> , M-Protein-Mutante

W

WT, +/+	Wildtyp
---------	---------

Y

YFV	Gelbfieber-Virus (hier: Gelbfieber-Impf-Virus)
-----	--

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen als Poster oder Abstract vorgestellt:

- 2016 TRIM9 expression influences replication of positive- and negative-stranded ssRNA viruses
Nowotny H., Pandey D., Tossounidis J., **Rueckel J.**, Protzer U., Endres S., Rothenfuß S.
Immunotrain 2.0, 1st international symposium „Immunotherapy of Cancer“:
Innate immunity meets tumor immunology, 2016, Munich, Germany
- 2015 TRIM9: a modulator of antiviral immunity to RNA viruses
Tossounidis J., **Rueckel J.**, Pandey D., Gaber H., Anton S., Willms S., Protzer U.,
Endres S., Rothenfuß S.
TOLL 2015, Targeting Innate Immunity Meeting, Marbeilla, Spain
- 2014 TRIM9: a new modulator of innate immune response
Anton S., Pandey D., **Rueckel J.**, Saathoff F., Protzer U., Endres S., Rothenfuß S.
44th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Bonn, Germany

Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Simon Rothenfuß, in dessen Arbeitsgruppe ich promovieren durfte. Dabei habe ich neben der inhaltlichen Betreuung ebenso die freundliche und motivierende Atmosphäre, die Förderung eigener Ideen sowie insbesondere seine jederzeit offenen Ohren für Anliegen seiner Doktoranden sehr zu schätzen gewusst.

Bedanken möchte ich mich weiterhin bei Herrn Professor Dr. Stefan Endres, der als Leiter der Abteilung für Klinische Pharmakologie das Vorhaben einer experimentellen Promotion zahlreicher Doktoranden unterstützt. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenso für die Möglichkeit der Assoziation an das Graduiertenkolleg 1202 der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie an das internationale Doktorandenkolleg „i-Target“ des Elitenetzwerks Bayern bedanken.

Herrn Dr. Dharmendra Pandey möchte ich für die methodische Unterstützung und Betreuung im Labor danken.

Bei Frau Professor Dr. Ulrike Protzer sowie Hanaa Gaber vom Institut für Virologie der Technischen Universität München bedanke ich mich für den inhaltlichen und methodischen Austausch sowie die Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich allen weiteren zu meiner Zeit aktiven Mitgliedern der Forschungsgruppe Julia Ahlfeld, Viktoria Bothe, Eva Heuer, Christine Heuer, Friederike Saathoff und Simone Willms sowie Lars Koenig und Johannes Rädler für die jederzeit freundliche, gegenseitig zuvorkommende Arbeitsatmosphäre und gute Stimmung danken.

Von Herzen danken möchte ich meinen Eltern Elisabeth und Andreas, die mir das Studium ermöglichten und auf deren liebevolle Unterstützung ich mich in jeder Situation stetig verlassen durfte.

